

23 JUL 1945
T. 71. — 1945

Mars-Avril. — N^{os} 3-4.

ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BIOLOGIQUES

Section : MICROBIOLOGIE ET APPLICATIONS A LA BIOLOGIE

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR **E. DUCLAUX**

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, L. MARTIN, G. RAMON,
J. TREFOUËL,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : **A. BOQUET.**



PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e)

SOMMAIRE DES N^{os} 3-4

	Pages
Recherches sur la toxine du vibron cholérique, par P. NOËL BERNARD et JEAN GALLUT . .	65
Recherches immuno-chimiques sur le vibron cholérique. — III. Mise en évidence de deux constituants toxiques de nature différente dans la toxine cholérique, par J. GALLUT et P. GRABAR	83
Inhibition par le succinate d'éthyle de l'action aggravante de l'huile d'olive sur la tuberculose du cobaye, par A. BERTHELOT, L. NÈGRE et J. BRETEY	93
Etudes sur la pneumopathie des cobayes. — I. La maladie des cobayes, par P. LÉPINE et M ^{lle} V. SAUTTER	105
Etude optique sur la forme géométrique de quelques bactéries (deuxième partie), par MARCEL GUILLOT	121
Activité antimicrobienne des sulfamidodiazines, par P. NITTI, C. COSAR et F. BOYER . .	142
Recherches sur les nucléoprotéides des micro-organismes. — I. Contribution à l'étude du problème analytique, par P. SARCIRON, R. VENDRELY et M ^{lle} O. BRIAND	147
Association des microbiologistes de langue française (<i>sommaire page 4 de la couverture</i>). . .	152

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome VII « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre de Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 200 fr. (5 dollars 25).

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P. NOËL BERNARD et LÉOPOLD NÈGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin.* Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 50 fr. (1 dollar 15).

J. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 175 fr. (3 dollars 90).

ANDRÉ-R. PRÉVOT. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Un volume in-8° de 228 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1940 : 50 fr. (1 dollar 15).

MARGUERITE LWOFF. — Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941 : 50 fr. (1 dollar 15).

L. NÈGRE et J. BRETEY. — Vaccination par le B.C.G. par scarifications cutanées. *Préface du professeur A. Marfan.* Un vol. de 104 pages avec 18 fig. (Collection Médecine et Chirurgie : Recherches et applications). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 25 fr.

L. JUSTIN-BESANÇON et A. LWOFF. — Vitamine antipellagreuse et avitaminoses nicotiniques. Un vol. de 288 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 90 fr.

MADELEINE MOREL. — L'acide nicotinique facteur de croissance pour « Proteus vulgaris » (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie} édit., Paris, 1943 : 65 fr.

ANDRÉ LWOFF, chef de Service à l'Institut Pasteur. — L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonctions chez les Micro-organismes. Hermann et C^{ie} édit., Paris, 1944 : 215 fr.

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1945

France et Colonies françaises : 240 fr.; Étranger : 340 fr..

Changement d'adresse : 5 fr.

Secrétariat, 25, rue du Dr Roux, Paris (XV°).

Cette Revue constitue une des sections de
L'ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BILOGIQUES

Prix d'abonnement à l'ensemble des 26 Sections

France et Colonies : 4.150 Fr.

Étranger : Tarif I, 6.000 Fr.; Tarif II, 6.140 Fr.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA TOXINE DU VIBRION CHOLÉRIQUE

par P. NOËL BERNARD et JEAN GALLUT.

HISTORIQUE.

De tout temps le caractère éminemment toxique des symptômes du choléra, l'évolution si rapidement mortelle de ses formes aiguës ont été attribués à une intoxication brutale par un poison inconnu.

Dès 1883-1884 Robert Koch [18] considère, sans pouvoir en apporter la preuve, que le choléra est une toxi-infection due à un poison sécrété par le bacille qu'il vient de déceler et d'isoler en culture pure. A la même époque, Strauss et E. Roux [37] admettent l'hypothèse d'un poison soluble élaboré par ce microbe.

Les premiers, Nicati et Rietsch [26], pendant l'épidémie de Marseille de 1884, mettent en évidence la toxicité des milieux de culture débarrassés par filtration des germes microbiens. Ces résultats sont confirmés par Van Ermengen (1884) [39] et par Koch lui-même en 1885 [19].

Dès lors, la toxicité des filtrats de culture n'est plus mise en doute. Mais tandis que Pétri (1890) [27] obtient en solution peptonée une toxine soluble, une toxopeptone, élaborée par les vibrions et mortelle, à la dose de 2 c. c., pour le cobaye du poids de 200 gr. par injection intrapéritonéale, Pfeiffer (1891) [28] attribue le pouvoir toxique des filtrats à une toxine intramicrobienne, une endotoxine, mise en liberté par la macération des corps microbiens après la mort des vibrions. Il provoque la mort des animaux d'expérience en leur injectant des vibrions cultivés dix-huit heures sur gélose et tués soit par le chloroforme, soit par chauffage à 56°. Il oppose cette endotoxine aux exotoxines diphtérique et tétanique dont elle se différencie

en ce qu'elle est impropre à immuniser activement contre le choléra expérimental et à provoquer la production d'une antitoxine dans le sérum des animaux auxquels elle a été injectée par doses progressives.

Gamaleia [13], en 1892, affirme l'existence de deux toxines cholériques dans le liquide de macération des corps microbiens, l'une vraisemblablement élaborée par les vibrions, thermolabile, cause de diarrhée chez le lapin, l'autre provenant de la destruction des corps microbiens, thermostable, et déterminant les autres éléments du syndrome cholérique.

Depuis lors la discussion s'est poursuivie entre les partisans de la toxine endocellulaire et de la toxine soluble. Ransom et Behring, en 1895 [33], reviennent à la conception, toujours combattue par Pfeiffer, d'un poison soluble diffusible, indépendant de la destruction du corps microbien, capable d'immuniser les animaux d'expérience et de donner à leur sérum un pouvoir antitoxique.

L'important mémoire de Metchnikoff, Roux et Salimbeni, paru en 1896 [25], apporte des précisions expérimentales d'un très grand poids en faveur de l'existence d'une toxine cholérique soluble. Salimbeni a résumé ce travail dans les termes suivants [35] :

Une expérience préliminaire très simple, imaginée par Roux, avait montré d'abord l'existence indiscutable d'un poison soluble et diffusible élaboré par le vibron cholérique. Un sac de collodion d'une capacité de 5 à 6 c. c., après avoir été stérilisé, rempli d'une solution de peptone à 2 p. 100, ensemencé avec une trace de culture de vibrions cholériques, était hermétiquement fermé et placé dans le péritoine d'un cobaye. Cette opération très simple pouvait être réalisée avec une pureté parfaite et quelques heures après le choc opératoire, l'animal paraissait tout à fait bien portant ; il le restait pendant deux à trois jours ; puis, brusquement, le ventre apparaissait légèrement distendu, l'hypothermie se montrait, les extrémités devenaient froides, le cobaye restait inerte, refusait la nourriture et enfin il succombait du troisième au cinquième jour avec tous les signes de l'empoisonnement cholérique. L'interprétation de cette expérience ne laissait aucun doute. Le vibron avait cultivé dans le sac sans passer dans le corps du cobaye comme le montraient les ensemencements du liquide péritonéal et du sang du cœur et le cobaye avait été tué par un poison soluble qui avait diffusé à travers le sac de collodion. Or, comme des vibrions morts placés en grande quantité dans les mêmes conditions ne donnent pas d'empoisonnement mortel, il fallait conclure que l'empoisonnement ne pouvait être dû qu'à la diffusion d'une toxine, élaborée pendant la période de vie active des vibrions.

Une expérience aussi rigoureusement conduite par de tels expérimentateurs reste acquise. Si les conclusions qu'ils ont formulées sont appelées à subir quelques rectifications, elles ne porteront

que sur l'interprétation des faits sans atteindre le fait lui-même du passage d'un élément toxique diffusible à travers les parois d'un sac de collodion.

L'existence de cette toxine est, en effet, confirmée par un certain nombre de travaux ultérieurs parmi lesquels ceux de Kraus (1903) [20], Brau et Denier (1906) [9], Pottevin et Violle [29]. Mais Kraus constate que, si toutes les souches de vibrions ne produisent pas de toxine soluble, elles donnent toutes une endotoxine. Brau et Denier, à l'Institut Pasteur de Saïgon, obtiennent une toxine plus régulièrement active par l'emploi d'un milieu spécial, composé de sérum et de sang défibriné de cheval, qui favorise, par la permanence de son alcalinité, le développement des vibrions fraîchement isolés dans des formes aiguës de choléra. Ils signalent la filtrabilité du principe actif, dont la production « semble liée à la macération des vibrions ». Mac Fadyean [24], réalisant alternativement la congélation et le dégel des corps microbiens, extrait une endotoxine et réussit à préparer l'antitoxine correspondante. En comparant les différentes solutions obtenues par le lavage des vibrions tués et vivants et les substances résiduelles, Takano (1918) [38] ne trouve aucune différence dans les symptômes produits par l'injection de ces solutions au cobaye et dans leur pouvoir immunisant. Il en conclut qu'il est très difficile de faire la distinction entre les endo et les exotoxines, la présence d'une toxine soluble dans le milieu de culture n'étant pas une preuve suffisante de l'existence de l'exotoxine.

Partageant ce point de vue, Martin Hahn et Julius Hirsch [15] apportent, en 1929, dans une étude très approfondie de la biochimie du vibron cholérique, des vues originales sur la préparation de sa toxine. Un dispositif ingénieux leur permet d'intensifier la multiplication du vibron par addition fractionnée du glucose, son aliment de choix, tout en maintenant constante la réaction alcaline du bouillon de culture. Dans ces conditions la production de la toxine s'effectue principalement « dans la phase de mort des vibrions », le filtrat d'une toxine soumise à l'ultrafiltration par le procédé Berkefeld Kezen n'est plus actif. Les auteurs concluent que la toxine appartient « à la classe des substances de haut poids moléculaire ».

Dès 1927 Landsteiner et Lévine [21] signalent la présence, dans le vibron, d'un complexe (glucides, acides gras et phosphore) susceptible de donner un polyoside haptène. Au cours de recherches très importantes (1932-1938) sur le vibron cholérique et sa structure chimique, Linton et ses collaborateurs insistent sur l'existence occasionnelle d'un « polysaccharide-lipoïde ».

A la suite des travaux de A. Boivin et de L. et F. Mesrobian (1933) [7], le vibron cholérique rentre dans le groupe de ces bactéries ne prenant pas la coloration de Gram dont ils ont isolé un

complexe dit glucido-lipidique, combinaison d'un élément phospholipidique et d'un polysaccharide. Ce complexe, représentant le principal élément de l'endotoxine du microbe et l'antigène somatique O [8], quitte le corps microbien pour diffuser dans le milieu dès que les cellules meurent et commencent à s'autolysier.

L'ensemble de ces recherches récentes oriente à nouveau le problème de la toxine cholérique dans le sens de l'endotoxine telle que la définissait Pfeiffer [28], avec cette aggravation que cette endotoxine, d'après M. Hahn et J. Hirsch [15], ne passe pas à travers les membranes filtrantes. Metchnikoff, Roux et Salimbeni [25] ont cependant obtenu la mort des animaux d'expérience par la diffusion d'une toxine soluble à travers la paroi d'un sac de collodion inclus dans la cavité péritonéale. La question de savoir s'il existe dans la toxine cholérique un ou plusieurs éléments toxiques n'est donc pas résolue.

D'autre part l'attention est retenue par la discordance frappante entre le faible pouvoir toxique de la toxine telle que l'ont obtenue au laboratoire les divers expérimentateurs et le caractère d'intoxication suraiguë du choléra humain. La dose mortelle pour un cobaye de 250 gr. est, en général, de 1 c. c. du milieu de culture de germes fraîchement isolés privé des corps microbiens par centrifugation, parfois de 0,50 c. c. à 0,25 c. c. Cependant, le choléra est la maladie toxi-infectieuse de l'homme la plus brutale et la plus rapidement mortelle. Au cours des épidémies les sujets les plus robustes, en parfait état de santé apparente, peuvent succomber quelques heures après l'apparition soudaine des premiers symptômes du syndrome cholérique. La mortalité générale peut atteindre au début des épidémies 80 à 95 p. 100 des cas déclarés. Or l'infection cholérique est caractérisée par la stérilité du sang et des organes et par la multiplication des vibrions dans les parois et le contenu de l'intestin grêle d'où les germes sont rejetés au dehors par des évacuations profuses.

Le faible pouvoir toxique, sur les animaux d'expérience, de la toxine obtenue au laboratoire est-il dû à ce que ces animaux sont réfractaires à l'infection cholérique qui est pour l'homme seul une maladie naturelle ? L'organisme humain favoriserait-il l'élaboration par les mêmes germes d'une toxine plus active ? Le hasard des isolements n'a-t-il pas encore permis de sélectionner les vibrions hautement toxigènes ? Le syndrome cholérique serait-il indépendant de l'activité de la toxine et sous la dépendance du phénomène d'anaphylaxie sur lequel Sanarelli [36] a appelé l'attention ? Ces questions restent toujours posées.

Enfin, dans l'hypothèse d'une toxine naturelle aussi peu active que la toxine obtenue au laboratoire, son action foudroyante s'expliquerait-elle par l'absorption d'une quantité massive, mise en liberté, par un processus biologique brutal et par le rôle adjuvant

des troubles fonctionnels (déshydratation, anurie) et des lésions organiques (rein, foie) qui s'opposent à son élimination ?

Le problème de l'intoxication cholérique apparaît donc très complexe et ne se limite pas à la dissociation des éléments constituant d'un bouillon de culture artificiel ou de vibrions entretenus au laboratoire.

RECHERCHES PRÉLIMINAIRES.

L'un de nous a repris depuis de longues années, en même temps que l'étude de l'épidémiologie du choléra [1], des recherches sur la toxine cholérique, soit en Indochine, soit en France, avec la collaboration intermittente, au cours de leurs déplacements coloniaux, de J. Guillermin, J. Gallut [4, 5], J. Raynal [3], Wang-Liang [2], C. Lataste, Mazeirat, Lefebvre et J. Blass. Un certain nombre de résultats n'apportant pas de faits nouveaux n'ont pas été publiés.

C'est ainsi que l'étude d'un grand nombre de souches indochinoises et de diverses origines, isolées par des techniques diverses aérobies et anaérobies, n'a pas décelé l'existence de vibrions producteurs d'une toxine plus active. Insuccès qui s'inscrit à la suite des investigations infructueuses poursuivies dans le même but depuis la découverte du vibrion cholérique (1881-1884), et notamment aux Indes, dans cette province du Bengale qui est le véritable foyer endémique du choléra.

De même, dans tous les laboratoires, quelle qu'ait été la technique employée, la toxine obtenue avec les vibrions les meilleurs producteurs est toujours restée dans les limites de faible activité que nous avons mentionnée. Nous n'avons pas été plus favorisés au cours de très nombreux essais de milieux de culture maintenus au pH optimum (7.5 à 8.2) en faisant varier la nature de leur composition dans diverses conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.

Pour rechercher quels seraient les corps susceptibles de favoriser la toxinogénèse, le milieu synthétique de Kemal Moukhtar [17] (phosphate disodique 8, asparagine 4, lactate d'ammonium 6, chlorure de sodium 5, eau 1.000) a été modifié et additionné de chacun de ces produits étudiés comparativement. Les peptones se sont montrées éminemment favorables. Les acides aminés glycocolle, leucine, lysine et histidine, et la glucosamine constituent de bonnes sources d'azote. Le tryptophane à 1 p. 1.000 a donné le meilleur développement de la culture et une toxine de valeur moyenne. L'adjonction de ces produits au bouillon de peptone pepsique de viande de veau, qui reste le milieu de choix (formule G. Ramon [32] pour la toxine diphtérique), n'a pas élevé le pouvoir de la toxine obtenue dans ce milieu de composition normale.

Il en a été de même pour divers liquides organiques, extraits d'organes, autolysats de levures, etc.

Sur les 23 oses et osides mis en œuvre, tous se sont montrés moins favorables que le glucose (Mazeirat).

De ces essais résultent cependant quelques indications qui confirment les importantes observations de M. Hahn et J. Hirsch [15]. Toutes les autres conditions étant comparables, l'activité de la toxine obtenue dépend de l'abondance de la culture, de la rapidité de la mort des vibrions et du nombre des germes morts au moment de la prise d'essai de la toxine. Le vibron cholérique pousse plus vite et plus abondamment sur les milieux glucosés que sur les milieux non sucrés. Il peut utiliser comme source d'énergie pour son développement aussi bien les constituants des protéides (peptone, acides aminés) que les glucides. S'il trouve des glucides dans le milieu, ceux-ci sont utilisés très rapidement et leur dégradation produit une acidification qui provoque l'arrêt de la culture et la mort massive des vibrions, même dans les milieux les plus riches en azote et les mieux tamponnés.

Le fait essentiel à retenir est que l'emploi du glucose déconseillé pour la culture du vibron cholérique peut devenir, dans certaines conditions, un facteur très utile à la mise en liberté de la toxine.

D'autre part il est apparu que dans une culture sur milieu solide gélosé, la plaque de gélose joue le rôle d'une éponge qui s'imprègne des substances solubles élaborées par le vibron cholérique. C'est ainsi qu'en recherchant l'existence d'un élément toxique mis en liberté par le vibron et retenu par les plaques de gélose, nous avons isolé deux de ces produits solubles. Le premier est la diastase qui réalise dans ses phases successives le phénomène de l'hémogestion, caractère biochimique du vibron cholérique (Van Loghem). C'est une protéidase dont nous avons étudié l'action et les propriétés [4]. Il y a lieu de rechercher si elle n'interviendrait pas dans la production des lésions organiques (rein, foie, intestin) qui apparaissent au cours du choléra et si elle ne serait pas un élément adjuvant de l'intoxication en réduisant l'élimination de la toxine.

En traitant comparativement des plaques de gélose, les unes ensemencées avec le vibron d'El Tor, les autres avec un vibron authentique, nous avons isolé des premières l'exohémolysine soluble caractéristique du vibron d'El Tor [5]. Par contre il a été impossible d'extraire de la gélose sur laquelle s'est développée une culture de vibron authentique, l'hémolysine capable de manifester le pouvoir irrégulier et fugace sur lequel Doorenbos [41] a attiré l'attention et que Van Loghem [41] a décrite comme une endohémolysine.

Aucune toxine soluble n'a pu être extraite des plaques de

gélose sur lesquelles s'étaient développées des cultures de vibrions authentiques et toxigènes en milieu liquide.

Les faits observés dans l'ensemble de ces recherches ramenaient donc à la toxine mise en liberté par la désintégration brutale d'un grand nombre de corps microbiens. Ils apportaient le moyen de réaliser un processus de cet ordre en utilisant l'acidité qui résulte de la fermentation du glucose par le vibrion cholérique.

UTILISATION DU GLUCOSE PAR LE VIBRION CHOLÉRIQUE COMME SOURCE D'ÉNERGIE

CONSOMMATION DU GLUCOSE. — Le vibrion cholérique utilisant de préférence les glucides comme source d'énergie, la consommation du glucose est, d'après Linton [23], deux fois plus grande en anaérobiose qu'en aérobiose. Lorsqu'une culture en milieu liquide est à son acmé, la réduction de l'oxygène de ce milieu se traduit par la décoloration du bleu de méthylène et la condition la plus favorable à l'attaque du glucose est réalisée.

Le tableau ci-dessous montre quels sont les besoins en glucose de vibrions cholériques récoltés sur boîtes de Roux après seize heures d'étuve à 37°, mis en suspension dans des ballons de bouillon glucosé à base de peptone pepsique de veau. La concentration microbienne est calculée en vibrions secs pour 1 c. c. de liquide, 4 mg., 10 mg., 21 mg. Le taux de glucose varie de 4 g. à 14 g. pour 1.000 (Travail inédit de M^{me} J. Blass).

TABLEAU. I. — Consommation maxima du glucose
(milligrammes par centimètre cube de toxine).

VIBRIONS par c.c. en mg.	TENEUR EN GLUCOSE					GLUCOSE consommé
	0 heure	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	
4	9,0	6,5	5,2	4,6	4,6	4,4
4	11,8	8,9	7,9	7,6	7,6	4,1
4	14,0		10,1	10,1	10,1	4,0
10	4,2		0,6	0,5	0,5	3,7
10	8,0		4,2	4,2	4,2	3,8
10	12,0		8,0	8,0	8,0	4,0
21	13,6	9,6		8,6	8,6	5,0

Il résulte de ces essais que le glucose consommé pour les trois concentrations microbiennes varie de 3,7 g. à 5 p. 1.000, quelle que soit la teneur initiale du bouillon en glucose.

Si dans une série de ballons de bouillon glucosé à 5 p. 1.000

nous faisons varier la concentration microbienne, nous pourrions suivre, dans le temps, la consommation du glucose.

TABLEAU II. — Variations de la teneur en glucose
au cours de sept heures à 37°
(milligrammes par centimètre cube de toxine).

CONCENTRATION microbienne par c. c. en mg.	POUR MILLE						
	0 heure	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	5 heures	7 heures
2	5	5	3,8	2,5	1,6	1,2	0,5
3	5	3,8	2,7	1,3	0,9	0,3	0,3
4,5	5	2,1	1,2	1,0	0,5	0,3	0,3
9	5	1,6	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3

Cette consommation étant d'autant plus rapide que la concentration microbienne dans un même volume de bouillon est plus élevée, une masse initiale de germes vivants équivalent à 9 mg. de vibrions secs pour 1 c. c. suffit pour désintégrer en deux heures 4,5 g. de glucose pour 1.000 c. c. de bouillon. Dans les mêmes conditions une masse équivalent à 2 mg. de vibrions secs met sept heures pour arriver au même résultat.

Cette limite de consommation du glucose est déterminée par le passage du pH initial = 8.00 à pH = 5.8. Cette acidification est due à la présence d'acide lactique, d'acide succinique, d'acide acétique et d'acide formique (analyses de Mme J. Blass, confirmant les résultats donnés par J. Hirsch [16].) Elle entraîne l'arrêt de la culture et la mort très rapide des vibrions.

TABLEAU III. — Variations du pH.

VIBRIONS par c. c. en mg.	0 HEURE	1 HEURE	2 HEURES	3 HEURES	4 HEURES	5 HEURES	7 HEURES
2	8,0	7,2	6,8	6,4	6,0	5,9	5,9
3	8,0	7,2	6,4	6,2	5,8	5,8	5,8
4,5	8,0	6,4	6,0	5,8	5,8	5,8	5,8
9	8,0	6,4	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

MODE DE PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE.

La préparation de la toxine [6] est fondée sur les données qui viennent d'être exposées. Une quantité déterminée et considérable de germes vivants est introduite dans un bouillon glucosé

dont la fermentation entraînera la mort des vibrions et la mise en liberté des éléments toxiques intramicrobiens. Nous avons utilisé les vibrions cholériques de provenance indochinoise isolés de cas de choléra certains et reconnus les meilleurs producteurs de toxine sur les 200 souches dont nous disposions.

1° L'ensemencement du vibron est fait en boîtes de Roux, sur gélose lavée à l'eau courante, additionnée d'eau peptonée à 3 p. 100 (peptone Chapoteaut) et ajustée à $\text{pH} = 8$ (soit $\text{pH} = 7.7 - 7.5$ après les chauffages successifs). Après dix-huit heures d'étuve à 37° la récolte est faite en eau bidistillée. Les vibrions sont recueillis par centrifugation.

2° Ils sont émulsionnés dans le bouillon à base de peptone pepsique de veau, dont la formule, établie par G. Ramon [32] pour la production de la toxine diphtérique, a été modifiée par l'ajustement à $\text{pH} = 8$ et l'augmentation du taux de glucose porté à 5 p. 1.000. Dans un volume de 20 c. c. de bouillon on met en suspension les vibrions recueillis sur la gélose de 3 boîtes de Roux. Dans les conditions de nos expériences la quantité de germes ainsi émulsionnés correspond à un poids de microbes desséchés de 8 à 10 mg. pour 1 c. c. de bouillon. On peut ainsi préparer des émulsions microbiennes de 250 à 500 c. c. de volume, qui sont mises à l'étuve à 37° . Les prélèvements successifs pour essais sur le cobaye sont additionnés de toluène et privés de corps microbiens par centrifugation prolongée. La filtration sur bougies diminue très fortement la toxicité du filtrat.

3° Le pouvoir toxique du liquide surnageant est appréciable après trois heures d'étuve, passe par un maximum entre la quatrième et la cinquième heure et diminue plus ou moins rapidement après la cinquième heure. A la quatrième heure, la dose mortelle est de 0,25 c. c. pour le cobaye de 250 g. et de 0,05 c. c. pour la souris blanche de 15 g., par injection intrapéritonéale. La toxine ainsi obtenue est de valeur au moins égale après quatre heures à la toxine élaborée par le même germe et dans le même milieu non glucosé après environ sept jours de culture.

Il est possible d'obtenir une toxine plus active en renouvelant dans le même bouillon les apports successifs de germes vivants dans les mêmes proportions. Quatre heures après chacun des apports, le milieu de culture, débarrassé des corps microbiens par centrifugation, ramené à la teneur de 5 g. de glucose p. 1.000, réajusté à $\text{pH} = 8$, est réensemencé avec des germes vivants dont la masse correspond à 8 à 10 mg. de vibrions secs pour 1 c. c. M^{lle} Lataste, dans notre laboratoire, a obtenu, après la dixième addition, une toxine dont la dose mortelle était réduite à 0,05 c. c., soit 1/20 de centimètre cube pour un cobaye de 250 g. J. Gallut a ramené à 1/500 de centimètre cube la dose mortelle pour la souris après le septième apport.

Il peut arriver, au cours de ces apports successifs, que la toxicité s'atténue après le cinquième et qu'elle disparaisse parfois entièrement par suite d'un phénomène intercurrent qui n'a pas été élucidé.

4° La toxine est donc mise en liberté par le processus vital de l'acidification du milieu de culture résultant de la fermentation du glucose par le vibron cholérique. La numération des germes de la suspension microbienne au cours du passage du pH = 8 du milieu de culture à pH = 5,8 montre que l'accroissement de la toxicité est sous la dépendance de la mort des microbes. Il atteint le maximum entre la quatrième et la cinquième heure, au moment où à peu près tous les germes ont cessé de vivre. La numération est faite sur gélose en boîtes de Petri par ensemencement de dilutions convenables de la suspension microbienne.

TEMPS ÉCOULÉ	pH	DIMINUTION du nombre des germes vivants p. 100
Après 0 heure	8	0
Après 0 h. 30	7	1
Après 1 heure	6,2	15
Après 2 heures.	5,8	70
Après 3 heures.	5,8	98
Après 4 heures.	5,8	99,5

Dans la même suspension en bouillon non glucosé, maintenu entre pH = 8 et pH = 7,5, la diminution des germes vivants n'est pas appréciable.

L'émulsion dans un même bouillon préalablement ajusté à pH = 5,8 donne après une macération plus ou moins prolongée une toxine beaucoup moins active.

5° La fermentation du glucose est le facteur essentiel de la mort du germe vivant. Toutefois la teneur en azote du milieu qui sert à la préparation de l'émulsion du microbe est un facteur non négligeable.

Les conditions de teneur en glucose, de pH, de densité microbienne étant les mêmes dans 5 milieux étudiés comparative-ment, la quantité de glucose consommé est différente ainsi que la toxicité dans le même temps. Nous avons comparé le bouillon de peptone pepsique de veau (formule Ramon) [32], le même milieu dilué de moitié, le milieu synthétique de Kemal Moukthar [47], normal ou additionné de quantités variables d'asparagine, l'eau salée physiologique (analyse de M^{me} J. Blass).

La consommation du glucose est deux fois plus élevée dans le bouillon de peptone pepsique que dans le même milieu dilué à parties égales avec de l'eau salée à 8 p. 1.000. En milieu synthétique, elle est en rapport avec la teneur en asparagine et de même

TABLEAU IV. — Teneur en N total et consommation de glucose en quatre heures à 37°.

MILIEU	VIBRIONS par c.c. en mgr.	N total	GLUCOSE initial p. 1.000	pH initial	pH final	GLUCOSE consommé
Bouillon Ramon.	8	1	5	8,2	5,8	4,2
Bouillon Ramon dilué à 1/2	8	0,5	5	8,2	6,2	2,4
Milieu synthétique.	10	0,2	5	8,2	6,2	2,4
Milieu synthétique + asparagine.	9	1	5	7,8	6,2	4,7
Eau salée glucosée	11	0	5	7,6	5,4	0,5

intensité qu'en bouillon de peptone pepsique lorsque la teneur en azote est la même dans les deux milieux. Par contre le milieu synthétique étant mieux tamponné (phosphates), le pH reste plus élevé et la mortalité des germes est plus lente et plus faible : de 75 à 90 p. 100 des germes vivants au lieu de 99,5 p. 100 en quatre heures. Le pouvoir toxique est moindre.

6° Les symptômes de l'intoxication par la toxine telle que nous l'avons obtenue reproduisent la description classique.

Deux à trois heures après l'injection intrapéritonéale au cobaye de 250 g. d'une dose mortelle, l'animal manifeste deux symptômes initiaux. L'hypothermie apparaît la première et s'accroît progressivement jusqu'à 34°, 32° et même 30°. La diminution du tonus musculaire se traduit d'abord par la parésie des membres postérieurs, l'animal restant capable de se dresser sur ses membres antérieurs, qui ne tardent pas à être atteints à leur tour. Il n'y a jamais de paralysie. Bientôt le corps mou et flasque s'effondre, l'abdomen distendu étalé sur le fond de la cage. Cet aspect se prolonge plusieurs heures. L'hypothermie persiste. L'animal se couche sur le côté, les membres tantôt en complet relâchement musculaire, tantôt agités par des crampes dont des cris plaintifs accusent le caractère douloureux. Il tombe bientôt dans une prostration générale, accompagnée de dyspnée et la mort survient de cinq à douze ou dix-huit heures après l'injection de la toxine. La diarrhée, fréquente chez le lapin, est exceptionnelle chez le cobaye. Lorsque la dose n'est pas mortelle, après dix-huit à vingt-quatre heures d'un état grave d'intoxication aiguë, la température remonte et l'animal revient rapidement à l'état normal. Parmi les animaux en apparence guéris, quelques-uns succombent dans les jours suivants par suite des lésions organiques consécutives à l'action de la toxine.

À l'autopsie, le péritoine contient une sérosité abondante qui découvre après son évacuation des plaques d'exsudat blanchâtre accolées aux viscères abdominaux. Quelques anses de l'intestin

grêle sont congestionnées à des degrés divers. La muqueuse stomacale est congestionnée, desquamée et présente parfois des ulcérations. Les capsules surrénales sont congestionnées ainsi que les reins et le foie.

Bien que les souris blanches soient considérées comme peu sensibles à la toxine cholérique, elles peuvent être utilisées lorsque leur poids reste voisin de 15 g. La dose minima mortelle est en général 0,05 c. c. et exceptionnellement 0,01 c. c. Les symptômes sont superposables à ceux que présentent les cobayes. L'hypothermie est très accusée, la diarrhée inconstante. La mort survient en moins de trente-six heures.

Chez le lapin inoculé par voie intraveineuse ou intrapéritonéale la symptomatologie est analogue dans son ensemble. Toutefois la congestion de quelques anses de l'intestin grêle est plus accusée, rappelant la teinte hortensia décrite chez l'homme et la diarrhée est fréquente.

7° Pouvoir antigène de la toxine. — Injectée à des lapins (5 doses croissantes de 0,25 c. c. à 3 c. c. espacées en vingt jours, saignée totale le trentième jour), la toxine provoque régulièrement la production d'anticorps, agglutinines et précipitines. Ces sérums nous ont permis de doser les toxines par la méthode de floculation et par la méthode chimique quantitative.

CARACTÈRES CHIMIQUES ET FRACTIONNEMENT DE LA TOXINE.

Qu'il existe un ou plusieurs éléments toxiques dans la toxine cholérique, ils sont renfermés dans le corps microbien et libérés au cours de sa désintégration. L'étude du fractionnement de ces éléments pondéralement très faibles serait très difficile à partir du milieu complexe que constitue le bouillon à base de peptone pepsique de veau.

Nous avons vu (tableau IV) que le vibrion cholérique attaque faiblement le glucose dans l'eau salée glucosée. Mais ce milieu n'étant pas tamponné, il suffit d'une consommation de glucose de 0,5 g. p. 1.000 pour faire passer le pH de 8 à 5,4 en deux heures, alors qu'il faut, en bouillon peptoné, une consommation de 4,5 g. de glucose pour que le pH atteigne 5,8 dans le même temps. Il en résulte que la mortalité des vibrions en quatre heures est de 99,5 p. 100. La dose minima mortelle pour la souris reste suffisante à 0,1 c. c. pour une souris de 15 g. alors qu'elle peut atteindre 0,01 c. c. en bouillon peptoné.

La toxine obtenue dans l'eau salée à 8,5 p. 1.000 et glucosée à 5 p. 1.000 ne contenant aucun élément azoté d'origine étrangère au vibrion lui-même a donc été adoptée pour toutes les recherches d'ordre chimique.

Cette toxine se présente sous l'aspect d'un liquide citrin, opa-

lescent, contenant en moyenne, en milligrammes, par centimètre cube :

Chlorure de sodium	8,5
Glucose	4
Substances bactériennes (chiffres variant suivant les souches de 1,5 à 2,2)	2

Ces substances bactériennes représentent environ 20 p. 100 du poids sec de vibrions mis en œuvre initialement. Nous avons abordé l'étude de leur composition en nous attachant en premier lieu au problème, jusqu'ici entier, du fractionnement des substances toxiques dialysables et non dialysables.

Les acquisitions récentes sur la nature des toxines bactériennes font admettre actuellement que les endotoxines sont des complexes glucidolipidiques, tandis que les exotoxines sont des protéides.

La toxine cholérique nous a paru *a priori* participer de ces deux groupes de substances ; en effet, c'est un liquide opalescent (signe de présence de glucidolipide) qui d'autre part donne les réactions générales des protéides.

Cette constatation ne peut-elle pas conduire à élucider la question de savoir s'il existe dans la toxine cholérique un ou plusieurs éléments toxiques et par suite à mettre en doute l'opinion devenue dominante d'une seule toxine de nature glucidolipidique ? S'il était démontré qu'un élément dialysable reproduit certains symptômes de l'intoxication cholérique, une telle observation ne nous ramènerait-elle pas à l'expérience de Metchnikoff, Roux et Salimbeni ?

C'est ce qu'il convenait de rechercher.

A. — L'un de nous (Gallut) [12] a précisé quelle était la part du complexe glucidolipidique dans la toxine cholérique. Ce glucidolipide en est un des éléments libres ; en effet, il peut en être isolé, sans recourir à aucun agent chimique, en utilisant simplement la dialyse.

La fraction glucidolipidique (absolument non dialysable à travers les membranes de collodion usuelles) reste accompagnée, suivant la porosité du collodion et le temps pendant lequel est poursuivie la dialyse, d'une quantité variable de protéides. En utilisant des membranes suffisamment perméables on retient uniquement le glucidolipide. Cette technique permet ainsi, sans même utiliser la précipitation par l'acide trichloracétique, d'isoler l'endotoxine qui est mise spontanément en liberté dans la toxine telle que nous l'obtenons.

Les deux modes d'extraction (dialyse seule ou précipitation par l'acide trichloracétique suivie de dialyse) donnent du reste des résultats sensiblement équivalents, par suite de l'hydrolyse des protéides, liés sans doute primitivement au complexe glucido-

lipidique. L'action de la protéidase spécifique du vibrion pourrait être envisagée à cet égard. Le processus naturel de mise en liberté du complexe glucidolipidique dans la toxine cholérique serait donc exactement comparable à celui du procédé de Raistrick et Topley [30] par digestion à la trypsine, dont il possède également le rendement favorable.

En effet, les chiffres de dosage ont montré [12] que le rendement en glucidolipide de cette toxine liquide était le plus souvent double de celui que l'on obtient en traitant les corps microbiens des vibrions fraîchement récoltés. De plus, après un séjour de quatre heures en milieux glucosés, les corps microbiens ne contiennent que des traces d'endotoxine glucidolipidique.

Pouvoir toxique du glucidolipide : De nombreuses expériences nous ont donné comme dose minima mortelle par voie intrapéritonéale la valeur de 0,05 mg. pour la souris de 15 g. (chiffre voisin de ceux attribués aux autres glucidolipides bactériens). Il faut en moyenne 0,5 mg. pour tuer un cobaye par la même voie, tandis que la même dose suffit parfois à tuer un lapin de 2 kg. par voie intraveineuse.

Chez la souris l'action toxique du glucidolipide se manifeste par une mort assez rapide (en moins de vingt-quatre heures). L'hypothermie est généralement très peu marquée et les symptômes n'ont rien de particulièrement spécifique.

A l'autopsie ce sont les signes congestifs qui dominent ; ils sont localisés à l'estomac, au duodénum, au jéjunum et aux surrénales.

Le pouvoir antigénique du glucidolipide est bien connu [10, 34]. Ce complexe représente en effet l'antigène somatique O du vibrion (Boivin) [8].

Injecté à des lapins par voie intraveineuse ou même sous-cutanée, il permet de déceler dans leur sérum des anticorps agglutinants quatre jours après une seule injection de 0,075 mg. (75 γ).

Cependant, pour l'obtention d'immunsérums très actifs, il est très difficile chez le lapin de dépasser, en 5 doses croissantes espacées sur vingt jours, une quantité totale maxima de 2 mg. de glucidolipide pur.

Nos sérums antiglucidolipides ont pu être dosés par la méthode de flocculation (Ramon et Boivin) [31] et par la méthode quantitative.

B. — Si l'isolement du glucidolipide ne présente aucune difficulté, il n'en est pas de même de la deuxième fraction toxique.

Par la dialyse en sacs de collodion (d'une porosité permettant le passage de l'hémoglobine), nous avons pu constater que les toxines dialysées perdaient une partie de leur toxicité en même

temps que disparaissaient les réactions des protéines. Il s'agissait donc du départ d'une fraction toxique vraisemblablement protidique.

La toxicité de cette fraction était difficile à mettre en évidence par suite de la dilution qu'entraîne la dialyse. En effet, pour manifester son pouvoir toxique, cette dilution exigeait l'injection aux petits animaux d'expérience d'un volume du dialysat hors de proportion avec leur poids ; utilisant les techniques dont nous disposions, l'un de nous (J. Gallut) est arrivé aux constatations suivantes.

Le volume du dialysat peut être réduit par la concentration à froid dans le vide. Il est préférable d'opérer l'ultrafiltration du liquide toxique sur bougie L² enduite de collodion acétique à 0,5 p. 100. La dose mortelle pour la souris est de 1,5 mg. environ, extrait sec de 8 à 10 c. c. du liquide ultrafiltré.

Mais ce résultat est inconstant. Il arrive que l'ultrafiltrat ainsi obtenu ne soit pas toxique. Lorsque la mort se produit elle est précédée par une hypothermie, très marquée, et qui s'établit rapidement. La mort survient moins vite qu'à la suite de l'injection d'une dose mortelle de glucidolipide. La congestion viscérale qui accompagne l'algidité dans le choléra expérimental ne se manifeste pas. Aucune lésion n'est apparente à l'autopsie.

A noter, en outre, que ces dialysats et ultrafiltrats donnent les réactions générales des protéides. Ils ne précipitent pas sous l'action du sérum antiglucidolipide obtenu en immunisant les lapins avec le complexe glucidolipidique cholérique pur alors qu'ils précipitent, quoique faiblement, avec le sérum antitoxine, obtenu en immunisant les lapins avec la toxine totale. Cette floculation recherchée suivant la technique de Ramon à une température de 45° est assez lente à apparaître (souvent plus de deux heures).

Ces deux réactions sériques donnent toute sa valeur à l'isolement par ultrafiltration sur collodion d'une deuxième fraction de la toxine cholérique. Toutefois l'inconstance des résultats due à la perméabilité irrégulière des sacs en collodion utilisés permet-elle une conclusion ferme ? Nous avons soumis cette difficulté à M. Grabar. Il a bien voulu reprendre avec l'un de nous (J. Gallut) cette étude par des méthodes chimiques et physico-chimiques plus précises et envisager le développement de ces recherches pour trancher définitivement la question du fractionnement de la toxine cholérique. Ces recherches feront l'objet d'un mémoire ultérieur de ces auteurs, mais nous pouvons d'ores et déjà indiquer la confirmation [44] des prémisses que nous avons exposées.

Ainsi, la constatation faite par Metchnikoff, Roux et Sahimbeni est confirmée, mais les résultats de leur expérience fondamentale comportent une interprétation nouvelle.

Cette expérience a été décrite dans la première partie de ce mémoire : une culture de vibrions cholériques développée en eau peptonée dans un sac de collodion hermétiquement clos, inclus dans le péritoine d'un cobaye, laisse diffuser à travers les parois du sac une toxine qui entraîne la mort de l'animal. Tel est le fait qui reste acquis.

Metchnikoff, Roux et Salimbeni l'interprètent dans le sens de l'existence d'une toxine soluble élaborée pendant la période de vie active des vibrions, conclusion opposée à la conception de Pfeiffer [28] d'une endotoxine, libérée par la mort et la destruction des vibrions.

La conception de Metchnikoff, Roux et Salimbeni répondait à l'état des notions admises en 1896 sur les exo et les endotoxines. La distinction entre ces deux toxines de nature et de formation différentes apparaît négligeable aujourd'hui et du fractionnement de la toxine cholérique se dégage l'interprétation suivante.

Le vibron cholérique produit dans le sac de collodion sa toxine complète, mise en liberté par la mort du vibron. La paroi du sac retient la première fraction glucidolipidique et laisse diffuser la seconde fraction, dialysable, capable de passer à travers les pores qui retiennent la première. La toxine est donc bien intimement liée au corps microbien comme le pensait Pfeiffer, mais elle comprend une fraction qui, de même que certaines toxines solubles, diffuse à travers les membranes de collodion, comme l'ont démontré Metchnikoff, Roux et Salimbeni. Leur observation est d'une telle précision qu'il est possible, en reprenant le texte de leur mémoire, d'établir une concordance à peu près complète entre certains résultats obtenus *in vitro* et les détails de leur expérimentation sur les animaux.

CONCLUSION

Aucune recherche n'a permis d'aboutir à la préparation d'une toxine cholérique d'activité telle qu'elle réponde au caractère hypertoxique des symptômes du choléra asiatique. Le mode d'action de la seule toxine, obtenue au laboratoire et d'un faible pouvoir toxique pour les animaux d'expérience, a suscité diverses hypothèses qui restent discutées. Sa nature n'a pas été entièrement élucidée.

La même toxine cholérique, d'une activité au moins égale aux meilleures toxines produites par des cultures de vibrions d'une durée de plusieurs jours, peut être obtenue en quatre heures ; des vibrions cholériques vivants, récoltés sur gélose, mis en suspension dans un bouillon glucosé, s'autolysent sous l'influence de l'acidification qu'ils déterminent par la fermentation du glucose. Les éléments toxiques inclus dans le corps microbien sont mis en liberté par la mort du vibron.

L'un de ces éléments est le complexe glucidolipidique décelé par des travaux antérieurs. Il est retenu par les sacs dialyseurs de collodion. Il détermine les symptômes de congestion et de nécrose viscérales et plus particulièrement gastro-intestinale qui sont une des caractéristiques de l'intoxication expérimentale par la toxine cholérique.

Des expériences préliminaires qui appellent de nouvelles recherches font entrevoir l'existence d'un deuxième élément toxique, dialysable, passant à travers les sacs de collodion qui retiennent le complexe glucidolipidique et déterminant le symptôme de l'hypothermie.

Les intoxications provoquées par chacun de ces éléments auraient donc une symptomatologie différente mais seraient mortelles l'une et l'autre pour les animaux d'expérience.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERNARD (P.-Noël), *Arch. I. Pasteur Indochine*, 1935, **6**, 3.
- [2] BERNARD (P.-Noël) et WANG-LIANG, *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1933, **26**, 146.
- [3] BERNARD (P.-Noël), RAYNAL (J.) et WANG-LIANG, *Ibid.*, 1933, **26**, 896.
- [4] BERNARD (P.-Noël), GUILLERM (J.) et GALLUT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 180, 303, 394, 478 et 568.
- [5] BERNARD (P.-Noël), GUILLERM (J.) et GALLUT (J.). *Ibid.*, 1939, **130**, 23, 147 et 228.
- [6] BERNARD (P.-Noël) et GALLUT (J.). *Ibid.*, 1943, **137**, 10 et 11.
- [7] BOIVIN (A.), MESROBEANU (I.) et MESROBEANU (L.), *Ibid.*, 1933, **113**, 40.
- [8] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). *Rev. Immunol.*, 1936, **2**, 113.
- [9] BRAU et DENIER. *Ces Annales*, 1906, **20**, 578.
- [10] CHECAGGI (L.). *Boll. Ist. Sier. Milan*, 1939, **18**, 391.
- [11] DOORENBOS (W.), *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 130.
- [12] GALLUT (J.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 123.
- [13] GAMALEIA (N.). *Arch. Med. Exp. et Anat. Path.*, 1892, **4**, 173.
- [14] GRABAR (P.) et GALLUT (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1943, **217** 559.
- [15] HAHN (M.) et HIRSCH (J.). *Centr. f. Bak.* 1927, **104**, 211.
- [16] HIRSCH (J.). *Z. f. Hyg.*, 1926, **106**, 433 et 467.
- [17] KEMAL MOUKTHAR. In *Calmette, Nègre et Boquet*, chez Masson, Paris, 1933, 410.
- [18] KOCH (R.). 1^{re} Conf. z. Erörter. der Cholerafrage, 1884, 33.
- [19] KOCH (R.). *Berlin. klin. Woch.*, 1885, n° 37.
- [20] KRAUS (R.). *Centr. f. Bakt.*, 12 septembre 1903, 34.
- [21] LANDSTEINER et LEVINE. *J. Exp. Med.*, 1926, **46**, 213.
- [22] LINTON (R. W.), SHRIVASTAWA (D. L.), SEAL (S. C.) et MOOKERJI (S. P.). *Ind. J. Med. Res.*, 1938, **26**, 41.
- [23] LINTON (R. W.), MITRA (B. N.) et MULLICK (D. N.). *Ibid.*, 1936, **23**, 589.
- [24] MACFADYEAN (A.). *Centr. f. Bakt.*, 1906, **42**, 365.

- [25] METCHNIKOFF (E.), ROUX (E.) et SALIMBENI (A. T.), *Ces Annales*, 1896, **10**, 256.
- [26] NICATI (W.) et RIETSCH (M.), *C. R. Acad. Sci.*, 1884, **99**, 928.
- [27] PETRI. *Arbeiten aus dem K. Gesundheitsamte*, 1890, **6**, 374.
- [28] PFEIFFER. *Zs. Hyg.*, Leipzig, 1891, **18**, 19 et 20.
- [29] POTTEVIN (H.) et VIOLE (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1913, 2029.
- [30] RAISTRICK et TOPLEY. *Brit. J. Exp. Path.*, 1934, **15**, 113.
- [31] RAMON (G.) et BOIVIN (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 230.
- [32] RAMON (G.). *Ibid.*, 1933, **112**, 8.
- [33] RANSOM (Dr.) et BEHRING (E.). *Deutsch med. Wochenschr.*, 1895, **29**, 457.
- [34] RAYNAL (J.), LIÉOU (Y.) et FEISSOLLE (L.). *Rev. Immunol.*, 1939, **5**, 317, et 1940, **6**, 132.
- [35] SALIMBENI (A. T.). *In Nattan-Lattier, Traité de Microbiologie*, chez Doin, Paris, 1934, **2**, 478.
- [36] SANARELLI (G.). *Il Colera* Ist. Editoriale scientifico, Milan, 1931.
- [37] STRAUSS et ROUX. *Bull. Acad. Méd.*, 5 août 1884, 1055.
- [38] TAKANO (R.). *in Etude du choléra au Japon. Org. Hyg. Soc. Nations*, Genève, 1926, Ch. 515.
- [39] VAN ERMINGEN. *Bull. Acad. Méd. Belgique*, 27 décembre 1884.
- [40] VAN LOGHEM. *Centr. f. Bakt. Abt. Orig.*, 1913, vol. 70.
- [41] VAN LOGHEM. *in de Vogel, Off. Intern. Hyg. publ.*, 1932, **24**, 262.

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES SUR LE VIBRION CHOLÉRIQUE

III. — MISE EN ÉVIDENCE DE DEUX CONSTITUANTS TOXIQUES DE NATURE DIFFÉRENTE DANS LA TOXINE CHOLÉRIQUE

par J. GALLUT et P. GRABAR (*).

*(Laboratoires des Instituts Pasteur Coloniaux
et Service de Chimie microbienne, Institut Pasteur, Paris.)*

Dès sa découverte le *Vibrium cholérique* a été considéré comme un microbe toxigène et de très nombreuses recherches ont été poursuivies par différents auteurs en vue de démontrer l'existence de substances toxiques. Nous n'essayerons pas de résumer tous ces travaux, mais il nous semble utile de rappeler ici deux faits essentiels. D'une part, les belles expériences de Metchnikoff, Roux et Salimbeni [1] qui ont montré que des Cobayes mouraient d'intoxication lorsqu'on leur introduisait dans le péritoine des sacs en collodion contenant une culture de *Vibrium*, et qui ont été interprétées dans le sens de l'existence d'une exotoxine pouvant dialyser à travers des sacs en collodion. D'autre part, le fait que le *Vibrium cholérique* possède une endotoxine de nature glucido-lipidique (1). Si l'existence de cette dernière était apparue immédiatement comme indiscutable, celle d'une toxine dialysable était discutée.

Les recherches poursuivies dans les Instituts Pasteur d'Indochine par P. Noël Bernard, C. Lataste, Mazeyrat, Lefebvre, J. Blass et J. Gallut permirent entre autres de préciser les conditions favorables à la toxinogénèse et aboutirent à l'élaboration d'une méthode de préparation rapide d'une toxine très active, pu-

(*) Mémoire présenté à la Séance du 6 décembre 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) LANDSTEINER et LEVINE [2] ont isolé, en 1927, une substance donnant les réactions des lipides et des glucides ; en 1933, BOIVIN et MESROBEANU [3], au cours de leurs études sur les antigènes somatiques O, ont montré que le *vibrium cholérique* possède une endotoxine de nature glucido-lipidique ; GALLUT [4] a étendu et complété ces recherches et a démontré la présence de cette endotoxine dans toutes les souches S, même celles des collections, contrairement à l'opinion de LINTON [5].

blée par P. Noël Bernard et J. Gallut [6]. La toxine peut être obtenue par cette méthode (voir Techniques) de manière à ne contenir, en dehors de NaCl et de glucose, que des produits d'origine microbienne, ce qui facilite grandement la tâche de celui qui s'attaque à la question de la purification ou du fractionnement de la toxine. La toxine totale ainsi obtenue est un liquide jaune fortement opalescent ; il contient en effet la presque totalité de l'antigène glucido-lipidique (g.-l.) des vibrions, mais il contient aussi des protéides [4]. On pouvait donc supposer, par analogie avec d'autres toxines bactériennes (par exemple, dysentériques [7, 8]), que cette toxine contenait à côté de l'endotoxine g.-l. une exotoxine protéidique.

Des essais préliminaires ont montré qu'en dialysant la toxine totale dans des sacs en collodion suffisamment poreux pour laisser passer l'hémoglobine, on obtenait parfois des dialysats toxiques (en concentrant toutefois ces dialysats dans le vide à froid). Mais, probablement à cause de l'impossibilité d'obtenir régulièrement des sacs en collodion de la porosité voulue, ces expériences n'étaient pas reproductibles et, par conséquent, les résultats ne pouvaient être considérés comme significatifs. Ces observations, ainsi que les résultats obtenus dans notre étude quantitative de la précipitation spécifique de la toxine totale par les divers immunsérums de lapin [9, 10] nous ont incités à entreprendre l'étude du fractionnement de la toxine cholérique par des méthodes physiques et chimiques. Nous nous sommes servis, d'abord, de la méthode de l'ultrafiltration fractionnée sur des membranes de porosité connue qui a déjà été utilisée par l'un de nous pour résoudre des problèmes de ce genre [41].

TECHNIQUES. — 1° La toxine cholérique a été préparée par la méthode de Bernard et Gallut [6] en mettant en suspension des vibrions de la souche Hanoï VII (type Inaba) cultivés sur gélose, dans de la solution physiologique glucosée à 5 p. 1.000. Cette suspension, après un temps de séjour dans l'étuve à 37° variable suivant les cas et indiqué dans nos tableaux, a été centrifugée ; le liquide surnageant ainsi obtenu est la toxine totale.

2° Les diverses préparations d'antigène glucido-lipidique ont été obtenues en traitant par l'acide trichloracétique, d'après la méthode générale de Boivin et Mesrobianu [3], soit des suspensions de vibrions lavés (« g.-l. extrait des vibrions »), soit la toxine totale (« g.-l. extrait de la toxine »). Le liquide opalescent obtenu a été soit seulement dialysé, soit traité après dialyse par de l'alcool pour précipiter le g.-l. qui a été enfin lavé par l'alcool-éther et l'acétone et séché.

3° Les expériences de dialyse ont été faites soit dans des cartouches de cellulose pour extraction imbibées de collodion acétique à 0,5 p. 100 de nitro-cellulose, soit dans des sacs de collodion à l'alcool-éther (nitro-cellulose 20 g. ; alcool 400 g. ; éther 150 g. ; glycérine 45 g.) qui laissent dialyser l'hémoglobine.

4° *L'ultrafiltration fractionnée* a été effectuée sur des membranes en collodion de porosité graduée [42] dans des appareils entièrement en verre [43] et en se servant d'air comprimé. Les porosités des membranes ont été désignées par les « diamètres moyens des pores », 2 R, et exprimées en $m\mu$. Pour tous les détails voir [41]. Quelques essais de filtration ont été exécutés aussi en recouvrant de collodion acétique à 0,5 p. 100 soit des bougies Chamberland L₂, soit des cartouches pour extraction en cellulose.

5° *Les immunsérums anti-g.-l. et anti- « toxine totale »* ont été obtenus par les techniques décrites précédemment [9]. Nous avons employé encore un sérum « anti-toxine fraîche » ; dans l'espoir d'obtenir un sérum neutralisant plus actif, nous avons essayé d'immuniser un lapin par des injections de toxine fraîchement préparée, et non conservée à la glacière comme les toxines qui servaient à la préparation des sérums « anti-toxine totale ».

6° *La présence ou l'absence du g.-l. dans les ultrafiltrats, dialysats, etc.*, a été contrôlée, dans les cas où ils n'étaient pas opalescents (signe très caractéristique pour les solutions contenant plus de 0,01 mg. de g.-l. par centimètre cube) par la précipitation spécifique avec un sérum anti-g.-l. Pour éviter une confusion possible avec le haptène glucidique qui aurait pu se trouver dans la toxine par suite d'un clivage éventuel du g.-l., on a utilisé un sérum anti-g.-l. saturé de polyoside.

I. — SÉPARATION DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE.

a) *Résultats expérimentaux.* — On pouvait supposer que l'antigène g.-l. était un complexe très volumineux rien que par le fait que ses solutions sont toujours opalescentes. Nous avons donc essayé de le séparer du reste des composés contenus dans la toxine totale par ultrafiltration. Pour cela, nous avons cherché le point terminal de filtration de l'antigène g.-l. (c'est-à-dire la membrane la plus poreuse qui le retient entièrement) d'abord extrait des vibrions, puis celui de l'antigène g.-l. extrait de la toxine totale.

Les résultats de nos expériences, résumés dans le tableau I, montrent : 1° que le g.-l. du vibrion, en solution dans l'eau bidistillée, est retenu totalement déjà par des membranes ayant $2 R = 620 m\mu$; 2° que le g.-l. extrait de la toxine peut traverser ces membranes et n'est totalement retenu que par des membranes de $2 R = 224 m\mu$ ou au-dessous. Remarquons cependant que dans ce cas le g.-l. a été dissous dans de la solution physiologique glucosée amenée au pH de la toxine totale, afin de se rapprocher des conditions dans lesquelles le g.-l. se trouve dans cette dernière. 3° Lorsqu'on ultrafiltre la toxine totale, le g.-l. de cette toxine est entièrement retenu par les mêmes membranes ($2 R \leq 224 m\mu$).

b) *Discussion.* — L'énorme différence entre la filtrabilité du g.-l. extrait du vibrion et de celui extrait de la toxine peut s'expliquer soit par des différences dans la composition chimique ou dans l'état d'agréation des deux produits, soit par l'effet qu'au-

TABLEAU I. — Ultrafiltration de l'antigène glucido-lipidique et de la toxine.

	POROSITÉ DES MEMBRANES 2R (EN mμ)							
	1.200	720	620	560	250	224	100	10
Glucido-lipide extrait du vibron cholérique. . .	++	+	—	—	—	—	—	—
Glucido-lipide extrait de toxine.	++	++	++	+	+	—	—	—
Toxine totale.	++	++	++	++	+	—	—	—

++, ultrafiltrat opalescent; +, ultrafiltrat non opalescent, précipitant par sérum anti-glucido-lipidique; — non précipitation par sérum anti-glucido-lipidique.

rait sur la filtrabilité du g.-l. le milieu dans lequel il est dissous. Nous ne possédons pas encore de données suffisantes pour exclure l'une ou l'autre de ces explications. En effet, en ce qui concerne la composition chimique, les dosages d'N pratiqués sur les diverses préparations de g.-l. et reproduits sur le tableau II ne permettent pas de tirer de renseignements précis; ils semblent cependant indi-

TABLEAU II. — Teneur en azote de diverses préparations d'antigène glucido-lipidique.

ORIGINE du glucido-lipide	AGENT d'extraction	MODE DE PURIFICATION	MILLIGRAMMES d'extrait sec	MILLIGRAMMES N total	POURCENTAGE N total
Vibrions.	CCl ³ .COOH.	Dialyse.	8,5	0,452	5,3
Vibrions.	CCl ³ .COOH.	Dialyse + précipitation (alcool, acétone, éther).	22,1	1,068	4,8
Toxine 4 heures. .	Néant.	Dialyse.	10,8	0,570	5,3
Toxine 4 heures. .	Néant.	U. F.	10,0	0,570	5,7
		2R = 224 mμ.			
Toxine 4 heures. .	CCl ³ .COOH.	Dialyse.	13,1	0,640	4,87
Toxine 4 heures. .	CCl ³ .COOH.	Dialyse + précipitation (alcool, acétone, éther).	13,0	0,646	4,9
Toxine 3 à 7 jours.	CCl ³ .COOH.	Dialyse.	10,0	0,366	3,66

quer que les g.-l. n'ayant pas subi de dessiccation par l'alcool-éther et l'acétone sont un peu plus riches en N et surtout que le g.-l. d'une toxine vieillie est moins riche en N. Les dosages quantitatifs des précipitations spécifiques [10] nous ont amenés à penser que le g.-l. de la toxine est plus complexe que celui extrait des vibrions. Le

complexe g.-l. subit probablement une certaine dégradation au cours de sa préparation et surtout pendant la conservation de la toxine (2). Il n'est pas impossible que le g.-l. extrait des vibrions soit à un état d'agrégation plus élevé ; on observe, en effet, que le g.-l. précipité par l'alcool et séché n'est jamais entièrement soluble et que ses solutions conservées ne sont pas parfaitement stables et finissent par donner un léger dépôt. Disons enfin, que la présence de glucose dans la solution de g.-l. ne devrait pas avoir d'action sur sa filtrabilité, mais que la présence de sel et le pH auraient pu l'influencer. Nous espérons pouvoir un jour trancher cette question. Pour le moment, ce qui nous importe surtout c'est de pouvoir séparer d'une manière complète le g.-l. Ce but a été atteint et nous pouvons, en ultrafiltrant les toxines totales sur des membranes de 2 R égal ou inférieur à 224 m μ obtenir des ultrafiltrats exempts d'antigène g.-l.

c) *L'activité biologique de l'antigène glucido-lipidique* est connue : il est toxique ; une dose de 0,05 mg. suffit pour tuer une souris de 15 g., et 0,5 mg. pour tuer un cobaye de 250 g. par voie intrapéritonéale, ou un lapin de 2 kg. par voie intraveineuse (3). A l'autopsie les animaux présentent des signes caractéristiques : congestion des surrénales, de l'estomac, du duodénum et du jéjunum. Les sérums anti-g.-l. ou anti-toxine totale protègent contre l'injection de plusieurs doses mortelles.

II. — ETUDE DE L'ULTRAFILTRAT EXEMPT D'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE.

a) *Résultats expérimentaux.* — Le tableau III, où sont réunies les diverses expériences entreprises pour obtenir des ultrafiltrats ou dialysats exempts de g.-l., montre que ces liquides ne sont pas toujours toxiques. Nous avons cherché à préciser les conditions nécessaires pour obtenir régulièrement des ultrafiltrats toxiques et nous avons pu nous rendre compte que les résultats diffèrent lorsqu'on fait varier le temps de séjour des vibrions dans la solution glucosée : une toxine de quatre heures donne un ultrafiltrat très faiblement toxique, il l'est régulièrement pour une toxine de vingt-quatre-quarante heures, tandis que la toxicité de l'ultrafiltrat diminue lorsqu'on s'adresse à une toxine de plusieurs jours. En ultrafiltrant donc une toxine de trente-quarante heures sur les mem-

(2) On pourrait trouver une certaine analogie dans les observations de MILES et PIRIE [14] sur la composition antigénique des *Brucella*. Ils trouvent un composé très complexe qui, par hydrolyse, donne un protéide et une substance analogue à l'antigène g.-l.

(3) L'extrême sensibilité du lapin vis-à-vis du g.-l. présente de graves inconvénients lorsqu'on utilise cet animal pour la préparation des sérums anti-g.-l. ou anti-toxine totale.

TABLEAU III. — Toxicité des ultrafiltrats et des dialysats obtenus dans diverses conditions.

NUMÉRO	MODE D'OBTENTION	ÂGE DE LA TOXINE	VOLUME INJECTÉ en centimètres cubes (1)	RÉSULTAT (2)	ANIMAL D'EXPÉRIENCE
1	Dialyse (collodion alcool-éther 5 p. 100).	4 heures.	1	0/6	Souris.
2	Dialyse (collodion alcool-éther 5 p. 100).	4 heures.	1	0/1	Souris.
3	Dialyse (collodion alcool-éther 5 p. 100).	2 heures.	5	0/1	Cobaye.
4	Dialyse (collodion alcool-éther 5 p. 100).	4 heures.	5	0/1	Cobaye.
5	U. F. (L ₂ + collodion acétique 0,5 p. 100).	3 heures.	1	0/5	Souris.
6	U. F. (L ₂ + collodion acétique 0,5 p. 100).	4 heures.	1	0/5	Souris.
7	U. F. (L ₂ + collodion acétique 0,5 p. 100).	4 jours.	1	4/4	Souris.
8	Dialyse (collodion alcool-éther 2 p. 100).	4 heures.	2,5 (1)	4/4	Souris.
9	Dialyse (collodion alcool-éther 2 p. 100).	4 heures.	2,25	1/3	Cobaye.
10	U. F. (2R = 224 mμ).	6 jours.	0,5	1/2	Souris.
11	U. F. (2R = 224 mμ).	4 heures.	4	0/1	Cobaye.
12	U. F. (cellulose + collodion acétique 0,5 p. 100).	4 heures.	1	0/2	Souris.
13	U. F. (2R = 224 mμ).	24 heures.	1	0/3	Souris.
14	U. F. (2R = 224 mμ).	4 jours.	1	1/3	Souris.
15	U. F. (2R = 224 mμ).	7 jours.	3 (1)	2/2	Souris.
16	U. F. (2R = 224 mμ).	4 heures.	5 (1)	0/2	Souris.
17	Dialyse (collodion acétique 0,5 p. 100).	3 jours.	1	6/6	Souris.
18	Dialyse (collodion acétique 0,5 p. 100).	7 jours.	1	6/7	Souris.
19	U. F. (2R = 224 mμ).	4 heures.	1	1/3	Souris.
20	U. F. (2R = 224 mμ).	24 heures.	2 (1)	2/2	Souris.
21	U. F. (2R = 224 mμ).	40 heures.	1	3/3	Souris.
22	U. F. (2R = 224 mμ).	6 jours.	1,5	4/4	Souris.

(1) Lorsque le volume à injecter aux souris était trop grand, on le réduisait par évaporation dans le vide.

(2) La fraction indiquée par son dénominateur le nombre d'animaux injectés, et par son numérateur le nombre d'animaux morts avant le quatrième jour.

branes qui retiennent complètement le g.-l. nous obtenons maintenant régulièrement un liquide toxique pour la souris et le cobaye.

Ce fait ayant été acquis, nous avons examiné les *propriétés chimiques* de notre ultrafiltrat, qui est un liquide limpide jaune citrin. Il donne une forte réaction d'indol et les principales réactions des protéides : biuret, Millon, xanthoprotéique. Il précipite, en outre, par le sulfate d'ammonium, l'acide trichloracétique et le tungstate de Na.

b) *Discussion des résultats.* — Par analogie avec d'autres toxines bactériennes, on pourrait supposer que cette substance toxique est un protéide, l'ultrafiltrat toxique donne effectivement les réactions caractéristiques de ces composés. Mais ce liquide peut

contenir aussi des protéides bactériens atoxiques. Cependant, lorsqu'on précipite l'ultrafiltrat par le tungstate de sodium et qu'on élimine ensuite par la baryte le tungstate du précipité lavé, la solution obtenue est toxique. Ce premier stade de purification de la substance toxique parle plutôt en faveur de sa nature protéidique, mais le tungstate peut précipiter aussi des substances non protéidiques. Nous espérons être bientôt en mesure d'apporter quelques précisions sur cette question en travaillant sur des quantités suffisamment grandes de toxine pour tenter de poursuivre la purification de la substance toxique de l'ultrafiltrat. Nous pouvons néanmoins dire dès maintenant que si cette substance est un protéide, il doit posséder une masse moléculaire relativement petite : en effet, une des propriétés essentielles de cette substance toxique est qu'elle dialyse assez facilement (expériences de Metchnikoff, Roux et Salimbeni) ; nous avons pu constater qu'elle peut traverser même des membranes de $2 R = 10,7 \text{ m}\mu$ (ces membranes arrêteraient, par exemple, les sérumglobulines), ce qui prouve que ses dimensions sont certainement inférieures à $4 \text{ m}\mu$ et même peut-être de beaucoup, puisque nous n'avons pas encore de données sur la porosité des membranes qu'il faut utiliser pour arrêter cette substance (4).

On pourrait tirer argument d'un autre aspect de la question, l'aspect immunochimique. Si la substance toxique est une vraie toxine protéidique, elle devrait être antigénique et, par analogie avec d'autres toxines bactériennes de nature protéidique, donner lieu à la formation d'antitoxine. Or, jusqu'à présent nous n'avons jamais pu protéger les souris contre l'effet toxique de cette substance par l'injection d'immunsérums, que ce soit des sérums anti-g.-l., anti-toxine totale, ni même anti- « toxine totale fraîchement préparée » (tableau IV).

Nous sommes ainsi amenés à penser que : a) ou bien la substance toxique de l'ultrafiltrat n'est pas antigénique, ce qui présenterait un argument en faveur de l'hypothèse que ce n'est pas un protéide, ou b) qu'elle n'est pas assez antigénique pour provoquer la formation d'antitoxine dans le sérum de lapin puisqu'elle est présente, dans la toxine totale, en quantité extrêmement faible. Il faut, en effet, tenir compte du fait que la dose mortelle de notre ultrafiltrat représente toujours un volume assez considérable (5).

(4) Dans leurs expériences sur le fractionnement de la toxine du *B. perfringens*, type C, GRABAR, LEVENSON et SCHNEIERSON [15] ont trouvé, à côté de l'hémolysine possédant une molécule relativement volumineuse, une substance toxique plus petite qui traverse même les membranes de $2 R = 5,9 \text{ m}\mu$.

(5) On peut tirer un renseignement analogue des expériences de METCHNIKOFF, ROUX et SALIMBENI [1] : pour aboutir à la mort du cobaye, ces

TABLEAU IV. — Essais de toxicité et de séroprotection (sur souris).

PRODUIT INJECTÉ	COMPOSITION	RÉSULTAT (1)	AUTOPSIE
Toxine totale	G.-l. + protide.	2/2	Congestion.
0,4 mg. de g.-l.	g.-l.	2/2	Congestion.
0,3 mg. g.-l. + 1 c.c. sérum anti-g.-l.	[G.-l. neutral.	0/2	Survie.
0,5 mg. g.-l. + 1 c.c. sérum anti-toxine	G.-l. neutral.	0/2	Survie.
1 c.c. ultrafiltrat (2R = 224 mμ).	Protides.	2/2	Pas de signes congestifs
Précipité tungstique de 1 c.c. de toxine totale	Protides.	2/2	Pas de signes congestifs
1 c.c. ultrafiltrat + 1 c.c. sérum antitoxine	Protides (non neutral).	2/2	Pas de signes congestifs
Précipité tungstique + 1 c.c. sérum antitoxine	Protides (non neutral).	2/2	Pas de signes congestifs

(1) Voir renvoi (2) tableau III.

On pourrait nous objecter que ce volume correspond aussi à un poids sec appréciable et que, simplement la substance possède une toxicité relativement faible, mais il nous semble bien plus probable que la substance toxique ne représente qu'une partie infime de ce poids sec. Dans ces conditions, pour avoir un sérum neutralisant il aurait fallu injecter aux lapins des quantités très importantes de toxine totale ; or, la présence de l'antigène g.-l. en grande quantité dans ce liquide exclut ce procédé, puisque le lapin est très peu résistant à l'égard du g.-l.

c) *Les propriétés pathogènes* de la substance toxique sont très caractéristiques. Son injection se traduit par un signe constant : l'hypothermie. Celle-ci est très marquée et rapide, la température tombant à 30° en moins de trois heures ; pour une dose mortelle elle finit par atteindre la température ambiante. La mort survient toujours moins rapidement qu'avec le g.-l., les souris succombent rarement avant vingt-quatre heures, presque toujours le deuxième ou le troisième jour.

Les mouvements respiratoires sont extrêmement ralentis, l'animal complètement prostré, réagit pourtant aux excitations par une contracture généralisée durant quelques instants qui laisse place ensuite à la flaccidité initiale. La diarrhée est assez inconstante. Ces phénomènes nous ont paru d'autant plus intéressants qu'ils se rapprochent beaucoup de ceux observés à la période dite d'algidité du choléra humain.

A l'autopsie les signes congestifs manquent totalement : esto-

auteurs ont dû employer des sacs en collodion d'au moins 3 cm³, mais de préférence de 5 ou 6 cm³ ; avec des sacs de 1 ou 2 cm³ les cobayes étaient malades, mais survivaient.

mac, intestin, surrénales ont leur teinte normale. On ne peut guère noter qu'une distension plus ou moins marquée des anses intestinales.

*
* *

A la lumière des faits que nous venons de résumer, ainsi que de nos essais publiés précédemment, nous croyons pouvoir encore apporter quelques éclaircissements sur la question si discutée de l'origine des deux substances toxiques. En effet, la toxine totale que nous utilisons est produite pendant la phase de mort des vibrions et on y retrouve le g.-l. qui est une endotoxine à côté de la substance toxique qui traverse les membranes de $2R = 224 \text{ m}\mu$. D'autre part, le fait que nous n'obtenons des ultrafiltrats régulièrement toxiques qu'après trente heures de séjour des vibrions dans la solution glucosée semble indiquer que la deuxième substance toxique se trouve d'abord combinée dans un complexe qui ne traverse pas cette membrane. Cette hypothèse est corroborée par nos observations basées sur des expériences quantitatives de précipitation spécifique [10]. Nous avons écrit alors : « Nous avons tout lieu de penser qu'au début de son élaboration la toxine contient un antigène g.-l. complexe, qui est ensuite clivé pour donner un g.-l. plus simple et une substance qui ne précipite pas avec les immunsérums ». Enfin, comme nous le disions ci-dessus, l'antigène g.-l. extrait d'une toxine vieillie contient moins d'N que les g.-l. extraits d'une toxine fraîchement préparée. Nous croyons donc avoir quelques raisons de supposer qu'au début de l'élaboration de la toxine, les deux substances toxiques se trouvent réunies dans un seul complexe, qui est ensuite clivé (par des diastases bactériennes, par exemple) et se sépare en un antigène g.-l. plus simple et une molécule plus petite qui est la substance toxique que nous retrouvons dans l'ultrafiltrat. Un mécanisme de ce genre explique d'ailleurs bien les expériences de Metchnikoff, Roux et Salimbeni, bien que ces auteurs les aient interprétées dans le sens d'une formation d'exotoxine.

En résumant ce que nous venons de dire, nous croyons avoir apporté des preuves de l'existence de deux substances toxiques dans la toxine cholérique. Leurs principaux caractères sont :

	ENDOTOXINE glucido-lipidique	SUBSTANCE TOXIQUE de l'ultrafiltrat
Dimensions :	> 80-100 $\text{m}\mu$.	< 4 $\text{m}\mu$.
Nature chimique :	Glucido-lipide.	Probablement protide (peut-être même protéide).
Action des sérums anti-g.-l. et antitoxine totale :	Neutralisée.	Pas neutralisée.
Effet pathogène :	Congestionnant.	Hypothermisant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] METCHNIKOFF (E.), ROUX (E.) et SALIMBENI. *Ces Annales*, 1896, **10**, 257.
- [2] LANDSTEINER et LEVINE. *J. exp. Med.*, 1927, **46**, 213.
- [3] BOIVIN (A.), MESROBEANU (I.) et MESROBEANU (L.). *C. R. Soc. Biol.* 1933, **113**, 490.
- [4] GALLUT (J.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 123
- [5] LINTON (R. W.), SCHRIVASTAWA (D. L.), SEAL (S. C.) et MOOKERJI (S. P.). *Ind. J. Med. Res.*, 1938, **26**, 41.
- [6] NOËL BERNARD (P.) et GALLUT (J.) *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 10-11.
- [7] OLITSKY et KLIGLER. *J. exp. Med.*, 1920, **31**, 19.
- [8] BOIVIN (A.). *Rev. d'Immunol.*, 1940, **6**, 86.
- [9] GALLUT (J.) et GRABAR (P.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 250.
- [10] GALLUT (J.) et GRABAR (P.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 307.
- [11] GRABAR (P.). L'ultrafiltration fractionnée et son emploi dans l'étude de substances biologiques. Paris 1943, chez Hermann et Cie.
- [12] GRABAR (P.) et LOUREIRO (J. A. DE). *Ces Annales*, 1939, **63**, 159.
- [13] GRABAR (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 70.
- [14] MILES (A. A.) et PIRIE (N. W.). *Br. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 278.
- [15] GRABAR (P.), LEVENSON (S.) et SCHNEIERSON (S. S.). *Ces Annales*, 1940, **64**, 275.

INHIBITION PAR LE SUCCINATE D'ÉTHYLE DE L'ACTION AGGRAVANTE DE L'HUILE D'OLIVE SUR LA TUBERCULOSE DU COBAYE

par A. BERTHELOT, L. NÈGRE et J. BRETÉY.

Après avoir mis en évidence avec A. Boquet l'influence activante de l'extrait acétonique de bacilles de Koch sur la tuberculose expérimentale des animaux de laboratoire, l'un de nous a constaté que l'huile d'olive, l'huile de foie de morue ainsi que les extraits acétoniques d'organes de mammifères ont la même propriété. Tous ces lipides, injectés régulièrement deux fois par semaine sous la peau d'animaux qui viennent d'être infectés avec un bacille de Koch virulent, activent l'évolution du processus tuberculeux. A la suite de ces observations, nous avons été conduits à entreprendre en commun des recherches pour essayer de déterminer les raisons de l'action aggravante exercée par les lipides et nous avons envisagé, parmi les causes possibles, le rôle que pourrait jouer à ce point de vue l'acido-cétose.

A. Szent Györgyi et A. Koranyi ont constaté que chez les sujets diabétiques présentant de l'acido-cétose, l'administration d'acide succinique *per os* détermine en quelques jours la disparition des corps cétoniques de l'urine ainsi que le relèvement de la réserve alcaline, et cela sans traitement insulinique. Dans l'hypothèse où l'action aggravante des injections d'huile d'olive sur la tuberculose du cobaye serait due à l'acido-cétose, nous nous sommes efforcés de vérifier si l'acide succinique inhibe cette action (1).

Nous avons substitué la voie hypodermique à la voie digestive employée par A. Szent Györgyi et A. Koranyi et comme nous devions naturellement éviter d'introduire des ions Na ou K dans l'organisme des cobayes traités par l'huile d'olive, nous avons adopté le succinate neutre d'éthyle que nous avons injecté en nature à la dose de 0,5 c. c. par cobaye d'environ 250 g.

(1) Le présent travail est strictement limité à l'étude du pouvoir inhibant de l'acide succinique sur l'influence aggravante de l'huile d'olive et de certains produits. Nous publierons dans un autre mémoire les expériences que nous avons faites pour éclaircir le rôle que peut jouer l'acidose dans le processus tuberculeux.

INFLUENCE DES INJECTIONS
DU MÉLANGE SUCCINATE D'ÉTHYLE + HUILE D'OLIVE SUR L'ÉVOLUTION
DES LÉSIONS TUBERCULEUSES DU COBAYE.

Nos expériences ont été conduites de la façon suivante : des cobayes infectés avec un bacille tuberculeux virulent ont été, dans chaque expérience, divisés en quatre groupes. Dans le premier (groupe témoin), les cobayes ne subissaient aucun traitement. Les animaux des trois autres lots recevaient deux fois par semaine en injection sous-cutanée, les uns un mélange de succinate d'éthyle et d'huile d'olive, les autres du succinate d'éthyle seul et les derniers de l'huile d'olive. Les injections de succinate d'éthyle à la dose de 0,5 c. c., poursuivies pendant deux mois environ, ont été bien supportées.

EXPÉRIENCE I. — 26 cobayes sont infectés le 19 janvier 1938 par injection sous-cutanée de 0,001 mg. d'une souche de bacilles tuberculeux bovins. 6 sont conservés comme témoins. 9 reçoivent deux fois par semaine, par voie sous-cutanée, à partir de leur inoculation, un mélange de 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et de 1 centicube d'huile d'olive ; 6 autres cobayes 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et 5 cobayes 1 centicube d'huile d'olive. Ils sont tous sacrifiés le 2 mars 1938.

Les cobayes traités par l'huile seule ou le succinate d'éthyle seul ont, outre leurs lésions ganglionnaires, de très nombreux tubercules sur la rate. Presque tous présentent des lésions plus ou moins nombreuses sur le foie et les poumons. Dans ces deux groupes, chacun de ces produits a manifestement activé l'évolution des lésions tuberculeuses, car chez les cobayes témoins, les tubercules sont moins nombreux sur la rate et sont exceptionnels sur les autres organes. Dans le groupe des cobayes traités par le mélange succinate d'éthyle + huile d'olive, *5 d'entre eux sur 9 ne présentent aucun tubercule sur la rate*, 2 quelques rares tubercules et 2 des tubercules plus nombreux. Les lésions des autres organes (foie et poumons) sont très rares.

Il ressort de cette expérience que l'huile d'olive, à la dose de 1 c. c., active le processus tuberculeux, comme l'un de nous l'avait déjà constaté. Le succinate d'éthyle, injecté seul à la dose de 0,5 c. c., a également une certaine influence activante. Par contre, lorsque ces deux produits sont injectés ensemble, ce double pouvoir activant disparaît. Il semble même que chez les animaux de ce groupe les lésions ont été un peu moins prononcées que chez les cobayes témoins.

EXPÉRIENCE II. — 31 cobayes sont infectés le 18 juin 1938 par injection sous-cutanée de 0,001 mg. de bacilles tuberculeux bovins. 13 cobayes sont conservés comme témoins. 6 cobayes reçoivent deux fois par

semaine, par voie sous-cutanée, le mélange de 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et de 1 c. c. d'huile d'olive ; 4 cobayes reçoivent 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et 8 autres cobayes 1 c. c. d'huile d'olive. Tous sont sacrifiés le 22 août 1938.

Dans ces quatre groupes de cobayes, les lésions du foie et des poumons sont exceptionnelles et peu importantes. Les seules différences observées portent sur les lésions de la rate. Nous avons constaté que dans les lots de cobayes traités séparément soit par l'huile d'olive, soit par le succinate d'éthyle, 50 p. 100 et 75 p. 100 des animaux ont de nombreux tubercules sur cet organe. Dans le groupe des témoins, 53 p. 100 des cobayes ont de rares ou d'assez nombreux tubercules spléniques ; dans celui des animaux traités par le mélange succinate d'éthyle + huile, 33 p. 100 *seulement d'entre eux présentent des lésions de la rate.*

Comme dans l'expérience précédente, les cobayes traités par le mélange succinate d'éthyle + huile ont donc eu moins de lésions que ceux traités par chacun de ces produits séparément et même que les témoins non traités.

EXPÉRIENCE III. — Le 19 septembre 1938, 25 cobayes sont infectés par injection sous-cutanée de bacilles tuberculeux bovins. 10 reçoivent deux fois par semaine, par voie sous-cutanée, à partir de la date d'inoculation, un mélange de 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et de 0,5 c. c. d'huile d'olive, 5 cobayes 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et 5 autres 0,5 c. c. d'huile d'olive. 5 cobayes sont conservés comme témoins. Ils sont tous sacrifiés le 19 novembre 1938. Les animaux qui avaient reçu les injections d'huile seule sont morts prématurément.

Dans le lot traité par le succinate d'éthyle seul, les 5 cobayes ont de nombreux tubercules sur la rate. Dans le lot des témoins, 2 cobayes ne présentent pas de lésions de la rate, les 3 autres quelques tubercules. Chez les 10 cobayes traités par le mélange succinate d'éthyle + huile, 9 *n'ont aucune lésion sur la rate*, 1 seul a d'assez nombreux tubercules. Dans aucun de ces groupes de cobayes il n'y a encore de lésions apparentes sur le foie et sur les poumons.

La réduction du nombre des lésions chez les animaux traités par le mélange succinate d'éthyle + huile a été encore plus marquée que dans les deux premières expériences.

On peut résumer les résultats des trois expériences précédentes par les chiffres consignés dans le tableau suivant :

Dans les expériences précédentes, les cobayes ont été infectés par voie sous-cutanée avec un bacille tuberculeux d'origine bovine moyennement virulent. Nous avons voulu voir si nous obtenions les mêmes résultats chez des cobayes infectés par la voie conjonctivale avec une souche de bacilles tuberculeux d'origine humaine très virulents.

Proportion des cobayes présentant des lésions de la rate.

	TÉMOINS p. 100	TRAITÉS		
		par le succinate d'éthyle + huile d'olive p. 100	par le succinate d'éthyle p. 100	par l'huile d'olive p. 100
1 ^{re} expérience. Délai : 6 semaines.	100	44	100	100
2 ^e expérience. Délai : 9 semaines.	53	33	75	50
3 ^e expérience. Délai : 8 sem. 1/2.	40	10	100	

EXPÉRIENCE IV. — 30 cobayes sont infectés par instillation oculaire de 1 goutte dans chaque oeil de la suspension en eau physiologique à 1 mg. par centicube de bacilles tuberculeux de la souche d'origine humaine 239.

9 sont conservés comme témoins, 8 sont traités deux fois par semaine par injection sous-cutanée du mélange de 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et 0,5 c. c. d'huile d'olive, 6 par 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et 7 par 0,5 c. c. d'huile d'olive.

Ils sont tous sacrifiés cinquante jours après leur inoculation. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau suivant :

	TÉMOINS	TRAITÉS		
		par le succinate d'éthyle + huile d'olive	par le succinate d'éthyle	par l'huile d'olive
Nombre moyen de tubercules par rate de cobaye.	7,1	5,2	5,3	20,5
Proportion des cobayes ayant pré- senté des lésions pulmonaires.	44 p. 100	12 p. 100	16 p. 100	85 p. 100

Il ressort de ces chiffres que les cobayes traités par l'huile d'olive sont ceux qui ont présenté les lésions les plus nombreuses sur la rate et ont eu leurs poumons le plus souvent et le plus gravement atteints. Dans le lot traité par le mélange succinate d'éthyle + huile, les lésions de la rate et des poumons ont été beaucoup moins prononcées non seulement que chez les cobayes traités par l'huile seule, mais que chez les témoins.

Les résultats concordants de ces quatre expériences et ceux

d'autres expériences qui ont été faites ultérieurement démontrent que le succinate d'éthyle injecté sous la peau deux fois par semaine, en même temps que de l'huile d'olive, inhibe l'action aggravante de cette dernière sur le processus tuberculeux. Il semble même que, chez les animaux traités par ce mélange, les lésions sont moins marquées que chez les cobayes témoins.

INFLUENCE DES INJECTIONS DE SUCCINATE D'ÉTHYLE SEUL
SUR L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS TUBERCULEUSES DU COBAYE.

Nous avons vu dans les expériences précédentes que le succinate d'éthyle injecté seul deux fois par semaine à la dose de 0,5 c. c. a, quoique bien supporté, une certaine action aggravante sur l'évolution des lésions tuberculeuses du cobaye. Nous nous sommes demandé si, en l'employant à des doses plus faibles, il ne perdrait pas cette influence activante et s'il n'aurait pas à lui seul une action retardante sur le processus tuberculeux.

EXPÉRIENCE V. — Le 25 septembre 1942, 20 cobayes sont infectés par instillation, dans chaque œil, de 1 goutte de la suspension à 1 mg. par centicube de la souche humaine 239.

6 sont conservés comme témoins. Deux autres groupes de 7 cobayes chacun sont traités deux fois par semaine par injection sous-cutanée de succinate d'éthyle, 7 avec 0,5 c. c. et 7 avec 0,1 c. c. Tous ces cobayes sont sacrifiés le 17 novembre suivant.

Dans chacun de ces groupes de cobayes, les lésions des poumons et du foie sont tout à fait exceptionnelles. Chez les témoins, les rates présentent régulièrement des tubercules au nombre de 5 à 20 par organe. Dans le lot des cobayes traités par 0,5 c. c. de succinate d'éthyle, les lésions spléniques sont un peu plus nombreuses que chez les cobayes témoins. Dans le groupe des cobayes traités par 0,1 de succinate d'éthyle, les tubercules de la rate sont légèrement moins nombreux que chez les cobayes témoins.

A la dose de 0,5 c. c., le succinate d'éthyle a donc eu, comme dans les expériences précédentes, une influence légèrement activante et une dose plus réduite : 0,1 c. c. de succinate d'éthyle n'a plus de pouvoir activant, mais n'exerce pas d'action retardante sur le processus tuberculeux.

EXPÉRIENCE VI. — 24 cobayes sont infectés le 25 novembre 1942 par injection sous-cutanée de 1/5.000 de milligramme de la souche humaine 239.

12 sont conservés comme témoins et 12 sont traités deux fois par semaine par injection sous-cutanée de 1/20 de centicube de succinate d'éthyle.

Ils sont tous sacrifiés le 29 janvier 1943.

Dans ces deux groupes de cobayes, les rates présentent à peu près le même nombre de tubercules. Sur le foie et les poumons, on observe des lésions de début avec une égale fréquence.

Avec la dose plus faible de 1/20 de centicube de succinate d'éthyle, les résultats sont les mêmes qu'avec 1/10.

EXPÉRIENCE VII. — Les mêmes résultats négatifs ont été obtenus chez 7 cobayes infectés par voie conjonctivale avec la souche humaine 239 et traités par des injections bihebdomadaires de 0,1 c. c. de succinate d'éthyle.

Injecté au cobaye deux fois par semaine à la dose de 1/10 ou de 1/20 de centicube, le succinate d'éthyle ne présente plus le pouvoir activant qu'il a à la dose de 0,5 c. c., mais il ne semble pas avoir la propriété de retarder l'évolution des lésions tuberculeuses.

INFLUENCE DES INJECTIONS

DU MÉLANGE SUCCINATE D'ÉTHYLE + GLYCÉRINE SUR L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS TUBERCULEUSES DU COBAYE.

Chez les animaux préalablement tuberculisés qui reçoivent régulièrement de la glycérine soit par la voie buccale (Long et Vorwald), soit par injections sous-cutanées (L. Nègre, Solomides), l'évolution des lésions est accélérée. Cependant cette activation est un peu moins marquée que celle exercée par l'huile d'olive. Nous avons recherché si le succinate d'éthyle inhibe le pouvoir activant de la glycérine, comme il inhibe celui de l'huile d'olive.

EXPÉRIENCE VIII. — 27 cobayes sont infectés le 20 mai 1943 par la voie sous-cutanée avec 1/2.000 de milligramme de la souche de bacilles tuberculeux humains 432.

9 sont traités deux fois par semaine par injection sous-cutanée de 0,5 c. c. de succinate d'éthyle et de 0,5 c. c. de glycérine ; 8 reçoivent 0,5 c. c. de glycérine ; 4 reçoivent 0,5 c. c. de succinate d'éthyle, 6 sont conservés comme témoins.

4 meurent prématurément dans le premier groupe. Tous ces animaux sont sacrifiés le 5 juillet.

Les cobayes témoins ont, outre leurs lésions ganglionnaires, de 2 à 12 tubercules sur la rate. Un seul d'entre eux a des tubercules plus nombreux sur cet organe. Aucun de ces animaux n'a de lésions sur le foie et les poumons.

Les 4 cobayes traités par le succinate d'éthyle ont les mêmes lésions ganglionnaires et spléniques que les cobayes témoins, 3 à 10 tubercules sur la rate, pas de lésions sur les autres organes.

Chez les 8 cobayes traités par la glycérine, à part 2 cobayes qui n'ont qu'une dizaine de tubercules sur la rate, les autres ont de nombreuses fines lésions sur cet organe, l'un de ces derniers a quelques tubercules sur le foie et les poumons.

Les 5 cobayes survivants du lot traité par le succinate d'éthyle

+ glycérine ont, comme dans le groupe précédent, 2 quelques tubercules sur la rate, les autres de très nombreuses lésions spléniques. L'un de ces derniers a en outre un début de lésions sur les poumons.

La glycérine a donc exercé sur l'évolution des lésions de ces cobayes une certaine activation que le succinate d'éthyle n'a pas inhibée.

INFLUENCE DES INJECTIONS

DU MÉLANGE SUCCINATE D'ÉTHYLE + GLUCOSE SUR L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS TUBERCULEUSES DU COBAYE.

Des expériences antérieures nous ont montré qu'une solution de glucose ou de saccharose à 10 p. 100 injectée trois fois par semaine par la voie sous-cutanée à des cobayes qu'on vient de tuberculiser active l'évolution de leurs lésions. Cette influence activante est cependant moins prononcée que celle de l'huile d'olive. Puisque A. Szent Györgyi et A. Koranyi ont constaté un relèvement de la réserve alcaline chez les sujets diabétiques traités par ingestion d'acide succinique, nous avons essayé de nous rendre compte si le pouvoir activant du glucose sur le processus tuberculeux du cobaye serait inhibé par l'acide succinique.

EXPÉRIENCE IX. — 54 cobayes sont inoculés le 20 novembre 1943 par voie sous-cutanée avec 1/5.000 de milligramme de la souche de bacilles tuberculeux d'origine humaine 432.

14 cobayes sont conservés comme témoins. 9 sont traités trois fois par semaine par injection sous-cutanée de 0,5 c. c. d'une solution de glucose à 10 p. 100 ; 7 cobayes reçoivent par la même voie 0,5 c. c. de glucose à 10 p. 100 + 0,5 c. c. de succinate d'éthyle ; 10 cobayes 0,5 c. c. de succinate d'éthyle ; 8 cobayes traités trois fois par semaine par injection sous-cutanée de 0,5 c. c. de glucose à 10 p. 100 ingèrent chaque jour 1 centimètre cube d'acide succinique à 5 p. 100, 6 cobayes absorbent chaque jour 1 c. c. d'acide succinique à 5 p. 100.

Ils sont tous sacrifiés le 25 novembre 1943.

Dans tous les groupes de cobayes, les lésions des ganglions sous-lombaires et celles de la rate sont à peu près semblables à celles des témoins. Dans le lot traité par le glucose seul, les lésions spléniques sont particulièrement nombreuses. L'activation du glucose s'est surtout manifestée par la présence beaucoup plus fréquente de tubercules sur le foie et les poumons chez les cobayes traités par ce produit. Ni le succinate d'éthyle, ni l'acide succinique n'ont entravé cette dissémination.

Le succinate d'éthyle injecté par voie sous-cutanée et l'acide succinique administré *per os* ne paraissent donc pas avoir une influence inhibante sur le pouvoir activant du glucose.

INFLUENCE DES INJECTIONS
DU MÉLANGE SUCCINATE D'ÉTHYLE + EXTRAIT ACÉTONIQUE
DE BACILLES DE KOCH
SUR L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS TUBERCULEUSES DU COBAYE.

L'extrait acétonique de bacilles de Koch, tel que nous le préparons, contient, par centimètre cube de suspension aqueuse, les lipides de ces germes correspondant à 1 cg. de bacilles desséchés. Ces lipides bacillaires, injectés deux fois par semaine à la dose de 1 centicube à des cobayes qu'on vient de tuberculiser, ont la propriété d'activer l'évolution des lésions de ces animaux (A. Boquet et L. Nègre). Nous avons cherché à nous rendre compte si cette action aggravante serait, comme dans le cas de l'huile d'olive, inhibée par le succinate d'éthyle.

EXPÉRIENCE X. — Le 5 juin 1941, 14 cobayes sont inoculés sous la peau avec 1/5.000 de milligramme de la souche humaine 239.

6 sont conservés comme témoins. Les autres, divisés en deux lots, sont traités par des injections sous-cutanées bihebdomadaires, 4 de 0,5 c. c. de succinate d'éthyle + 1 centicube d'extrait acétonique de bacilles de Koch, et 4 de 1 c. c. d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Ils sont sacrifiés le 9 juillet suivant.

Les cobayes témoins ont de 6 à 20 tubercules sur la rate. Un seul d'entre eux a quelques tubercules sur le foie et les poumons. Tous les cobayes du groupe traité par l'extrait acétonique de bacilles de Koch présentent de très nombreux tubercules sur la rate, 3 sur 4 ont des lésions du foie et des poumons. Dans le lot traité par le mélange succinate d'éthyle + extrait acétonique de bacilles de Koch, 2 cobayes ont de très nombreux tubercules sur la rate, 2 des lésions moins nombreuses. Aucun d'eux n'a de lésions sur le foie et sur les poumons.

EXPÉRIENCE XI. — Le 25 septembre 1942, 10 cobayes sont infectés par instillation conjonctivale de 1 goutte dans chaque œil de la suspension en eau physiologique à 1 mg. par centicube de la souche humaine 239.

4 sont conservés comme témoins, 3 sont traités par le mélange de 0,5 c. c. de succinate d'éthyle + 1 c. c. d'extrait acétonique de bacilles de Koch et 3 par 1 c. c. de cet extrait. Ils sont sacrifiés le 17 novembre suivant.

Dans les trois groupes, les rates présentent à peu près les mêmes lésions : de 5 à 20 tubercules. Dans le lot traité par l'extrait acétonique, tous les cobayes ont des lésions pulmonaires. Chez les témoins, aucune lésion de cet organe n'est décelable et chez les traités par le mélange succinate d'éthyle + huile, 1 cobaye sur 3 a d'assez nombreux tubercules sur les poumons.

Si, dans ces deux expériences, le succinate d'éthyle paraît avoir empêché dans certains cas l'extension des lésions aux poumons,

il n'a pas entravé le développement des tubercules sur la rate. Il semble donc que si ce produit présente un certain pouvoir inhibant sur l'action aggravante de l'extrait acétonique de bacilles de Koch, ce pouvoir est beaucoup moins prononcé que dans le cas de l'huile d'olive.

CONCLUSIONS.

Ces expériences nous ont d'abord permis de confirmer que, chez des cobayes qu'on vient de tuberculiser, les injections sous-cutanées d'huile d'olive à la dose de 1 centicube répétées deux fois par semaine activent régulièrement le processus tuberculeux avec production sur la rate d'un nombre plus élevé de lésions que chez les animaux non traités et généralisation plus rapide aux autres organes.

Le succinate d'éthyle, injecté seul à la dose de 0,5 c. c. aux mêmes intervalles possède aussi un certain pouvoir aggravant sur l'évolution des lésions, quoique moins prononcé que celui de l'huile d'olive.

Chez les cobayes traités par le mélange de succinate d'éthyle et d'huile d'olive, il y a en général non seulement inhibition de toute activation, mais même chez quelques animaux une certaine diminution dans le nombre et l'importance des lésions par rapport à celles des animaux témoins.

Il semble donc que l'huile d'olive et le succinate d'éthyle qui, injectés à part, activent le processus tuberculeux, acquièrent, chez la plupart des animaux, la propriété de le ralentir lorsque ces deux produits sont introduits en mélange dans l'organisme du cobaye tuberculeux.

Lorsqu'on diminue la dose de succinate d'éthyle, 0,1 c. c. ou 0,05 c. c. au lieu de 0,5 c. c., ce produit n'a plus d'action aggravante sur le processus tuberculeux, mais il ne retarde pas l'évolution des lésions.

L'influence activante des injections répétées de glycérine, de glucose et d'extrait acétonique de bacilles de Koch sur le processus tuberculeux du cobaye ne paraît pas inhibée par le succinate d'éthyle comme dans le cas de l'huile d'olive.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHELOT (A.), NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **213**, 90.
BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 3 mars 1924.
KORANYI (A.) et SZENT-GYÖRGYI (A.). *Deut. Med. Woch.*, 1937, 1029.
LONG (E. R.) et VORWALD (A. J.). *Amer. Rev. Tub.*, 1930, **22**, 636.
NÈGRE (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 1107 ; *Rev. Tub.*, 1932, **13**, 889 ;
Ces *Annales*, 1932, **49**, 319.
SZENT-GYÖRGYI (A.). Studies on biological oxidation and some of its catalysts, Budapest ; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 846.

ÉTUDES SUR LA PNEUMOPATHIE DES COBAYES

I. — LA MALADIE DES COBAYES (*)

par P. LÉPINE et M^{lle} V. SAUTTER.

Nous avons rapporté ailleurs avec R. Lamy [4] les premières expériences qui nous ont permis d'isoler un nouvel ultravirus, celui d'une maladie enzoo-épzootique du cobaye, qui a sévi dans les élevages de l'Institut Pasteur. Cette affection, que nous avons dénommée « pneumopathie des cobayes » en raison du plus marquant de ses symptômes, nous est apparue comme une contamination secondaire au cours de recherches portant sur un autre sujet.

Des organes d'un cheval suspect d'entérite épzootique, reçus au Service Vétérinaire de l'Institut Pasteur, nous étaient confiés par notre collègue R. Lamy pour des recherches sur l'étiologie de cette affection. Le 5 mars 1943, des émulsions de rein, rate, foie et moelle osseuse (préalablement reconnues bactériologiquement stériles par ensemencement sur les milieux usuels) étaient inoculées entre autres animaux (souris, lapins, etc.) à 8 cobayes, dont 5 succombaient entre le dix-huitième et le vingt-cinquième jour avec une symptomatologie particulière qui fut constamment retrouvée au cours des passages ultérieurs qui furent effectués avec le sang, le cerveau et différents organes de ces cobayes. Dès les premiers passages, nous suspicions qu'il ne s'agissait pas là d'une maladie du cheval transmise au cobaye, mais bien d'une maladie latente de ce dernier animal, mise en évidence par le traumatisme de l'inoculation. En effet, à peu près simultanément, dans notre laboratoire, d'autres cobayes inoculés avec des souches de passages de différents virus succombaient avec la même symptomatologie anormale, au lieu de présenter l'aspect habituel, et, dans les stocks d'animaux neufs de l'Institut Pasteur, nous pouvions bientôt observer un certain nombre de décès spontanés de cobayes présentant toujours le même tableau clinique et anatomo-pathologique.

Ajoutons que les mêmes organes du cheval qui avaient été à l'origine des premiers cas de pneumopathie, conservés en glycérine et à la glacière, ou congelés à basse température, repris ultérieurement pour être inoculés à des cobayes provenant d'un éle-

(*) Association des Microbiologistes de Langue Française, séance du 6 janvier 1944.

vage non contaminé, n'ont déterminé chez ces animaux aucune espèce de symptôme pathologique.

Enfin les 3 cobayes restés indemnes lors de l'isolement du virus ont été éprouvés ultérieurement avec ce dernier : ils ont succombé en même temps que les témoins.

Il était donc évident — et nous le disons ici pour n'avoir pas à y revenir — que nous avons affaire à une maladie spontanée du cobaye et que les diverses inoculations pratiquées avaient simplement joué sur l'infection latente le rôle de traumatisme déclenchant : c'est là un phénomène connu, qui est fréquent dans les études sur les ultravirus pathogènes.

Car c'est bien à un ultravirus que nous avons affaire. Ses caractères seront précisés dans un deuxième Mémoire ; disons seulement que le sang et les différents organes des cobayes (à l'exception des poumons dans certains cas dont nous parlerons ci-après) se montrent constamment privés de tout germe visible susceptible de se développer sur les milieux aérobie ou anaérobie connus, que les filtrats de sang ou des différents organes sur bougie Chamberland L2 et L3 sont hautement virulents et que les caractères généraux de résistance et de conservation de ce virus vont de pair avec ceux de la plupart des ultravirus pathogènes des animaux.

SYMPTOMATOLOGIE DE LA MALADIE.

C'est avant tout la maladie expérimentale que nous décrirons, la maladie spontanée restant le plus souvent latente et n'étant guère diagnostiquée qu'à l'autopsie des animaux qui meurent dans les stocks d'élevage.

Dès le sixième passage sur le cobaye, le virus a pris des caractères de fixité, et a déterminé une maladie dont la symptomatologie n'a pas varié. Après l'inoculation, quel qu'en soit le mode nous avons procédé habituellement à l'inoculation sous-cutanée d'une suspension au 1/50^e environ d'organes contaminés ; nous avons aussi employé fréquemment le sang prélevé à l'acmé de la période fébrile, dilué avec du bouillon ou de l'eau physiologique, et injecté par voie intracérébrale ou sous-cutanée (1)], on voit survenir la fièvre à partir du cinquième jour de l'inoculation (fig. 1). Celle-ci évolue irrégulièrement entre 40° et 41°, dépassant rarement cette température. On observe en outre, dès le troisième jour de l'inoculation, un amaigrissement du cobaye qui progresse très

(1) L'inoculation intracérébrale ne modifie en rien le comportement du virus ni l'évolution de la maladie. Elle a l'avantage de mettre en évidence, par la méningite septique qui en résulte, la présence de tout germe de contamination secondaire pouvant se trouver dans le matériel injecté, notamment quand il s'agit de sang ou de broyat de poumon.

rapidement, au point qu'à l'autopsie, des animaux dont le poids était normal au moment de leur inoculation paraissent littéralement émaciés. C'est ainsi, par exemple, qu'un cobaye de 550 g. inoculé par voie nasale, succombe le 9 juin, ne pesant plus que 370 g. ; il a donc perdu le tiers (32,7 p. 100) de son poids (fig. 2). La mort survient le neuvième ou le dixième jour en hypothermie. Il n'y a ni jetage, ni sécrétion nasale notable, ni, à part une certaine dyspnée, aucun symptôme remarquable. La durée de la maladie est

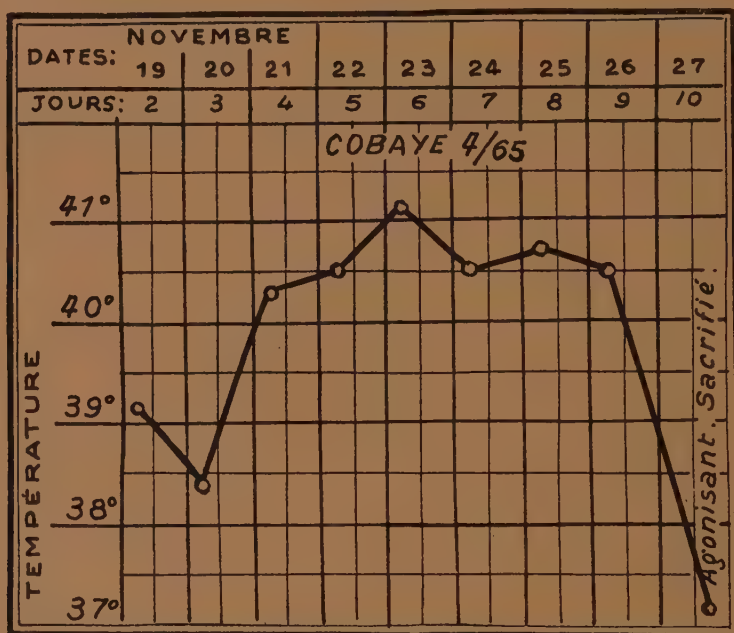


FIG. 1. — Cobaye. Pneumopathie expérimentale. Courbe thermique typique.

remarquablement constante, quelle que soit la voie d'introduction du virus. C'est ainsi que 20 cobayes inoculés par voie cérébrale présentent une maladie d'une durée moyenne de 9,7 jours, alors que 20 cobayes inoculés par voie sous-cutanée font une maladie durant en moyenne 9,9 jours.

La maladie suit un cours régulièrement fatal et aucun des animaux que nous avons inoculés avec un produit ayant fait preuve de sa virulence n'a jusqu'ici survécu. Tout au plus observe-t-on, avec des émulsions diluées aux taux proches de la limite de la virulence, un allongement de la période d'incubation qui reporte la mort au voisinage du quinzième jour. Ce caractère constamment fatal de l'infection expérimentale semble opposer cette dernière à

la maladie spontanée qui, comme nous l'avons observé sur nos élevages, sévit à l'état endémique, ne déterminant qu'une faible mortalité, et infecte de façon latente des animaux gardant l'apparence de la santé.

Le fait que les élevages de l'Institut Pasteur aient été atteints d'une infection latente et qu'il nous ait souvent été difficile, par suite de la pénurie des animaux, de nous procurer des cobayes de

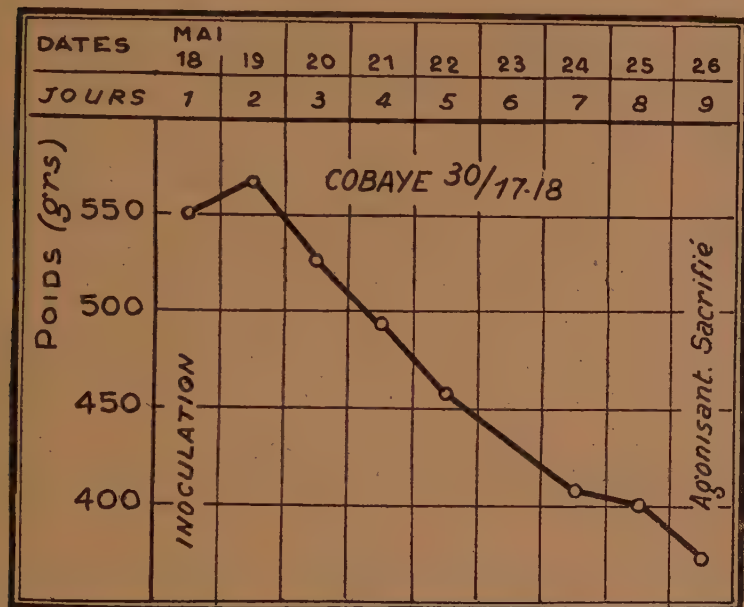


FIG. 2. — Cobaye. Pneumopathie expérimentale. Perte pondérale de l'animal depuis le jour de l'inoculation jusqu'à celui de la mort.

source certainement indemne de virus, a grandement gêné nos expériences et contribué à en retarder le développement. Nous indiquerons plus loin ce que nous avons pu voir du mode de contamination spontanée. Disons tout de suite que, dans nos essais, nous avons considéré comme suspect de contamination de cage et rejeté de nos résultats expérimentaux, tout décès survenant après le quinzième jour de l'inoculation.

ANATOMIE PATHOLOGIQUE MACROSCOPIQUE.

L'amaigrissement de l'animal frappe dès l'instant où on le fixe sur le plateau à autopsie. A l'ouverture de la cavité thoraco-abdominale, on observe de façon constante une pneumopathie d'un type

particulier. Les deux poumons sont généralement atteints, quoique de façon inégale. Le processus d'apparence pneumonique atteint en sa presque totalité les poumons, prédominant aux extrémités des lobes tout en respectant dans les zones moyennes des portions qui ont gardé leur apparence normale. L'aspect du poumon congestionné n'est pas, cependant, celui d'une hépatisation franche ; sa teinte en est moins régulièrement foncée, elle présente des parties rouge vif, quelquefois rose clair, et à la coupe on peut constater que l'atélectasie des alvéoles n'est pas totale : les fragments atteints surnagent sur l'eau lors de l'épreuve de la flottation. Il existe en outre fréquemment un exsudat pleural peu abondant, de couleur citrine, et parfois un peu de liquide dans le péricarde ; dans la cavité abdominale, on trouve un épanchement clair assez abondant ; ce liquide est parfois fortement teinté de sang ; il s'agit, dans ce cas, d'hémorragies dues à des ruptures microscopiques de la rate, particulièrement friable. Nous pensons que ces hémorragies ne surviennent pas spontanément, mais qu'elles résultent du traumatisme minime de la contention des animaux lors de la prise de température.

La rate est de teinte foncée, légèrement hypertrophiée, et se déchire facilement (2).

Les autres organes : intestin, surrénales, présentent une congestion de moyenne intensité. Le foie n'a ni aspect, ni lésions particulière ; notons cependant que de façon constante la vésicule biliaire est gonflée de bile.

HISTOPATHOLOGIE DES LÉSIONS.

Deux organes : le poumon et la rate, présentent sous le microscope des lésions caractérisées, d'une nature si particulière qu'elles prennent une valeur spécifique et permettent, par leur constatation conjuguée, de faire aisément le diagnostic de la maladie (3).

1° LÉSIONS PULMONAIRES. — L'étude en série des lésions du pou-

(2) Chez les animaux spontanément infectés de notre élevage, nous avons fréquemment observé une rate petite, atrophiée, de teinte orange ; les lésions histologiques que l'on y rencontre sont du même type général que celles décrites plus loin dans la maladie expérimentale, mais avec une atrophie plus grande encore des cellules nobles et un développement notable du tissu conjonctif. Quoique nous pensions qu'il s'agisse là d'une forme chronique de la maladie dont le tableau expérimental réalise le stade aigu, nous n'avons pas pu encore en effectuer la démonstration ni prouver que nous n'avons pas affaire, dans ce cas, à un syndrome pathologique complexe.

(3) Toutes les photomicrographies qui illustrent ce mémoire sont dues à M. Jeantet, auquel nous adressons nos remerciements.

mon nous montre que nous avons affaire à un processus pneumopathique à évolution centripète. Celui-ci débute, en effet, du cinquième au septième jour, au contact de la plèvre viscérale qui demeurera saine jusqu'à la fin, et se développe de proche en proche vers le centre du lobe atteint (fig. 3 et 4). Il se caractérise par une infiltration intense de la paroi des alvéoles pulmonaires, avec œdème et desquamation dans la cavité alvéolaire. L'aspect histologique se différencie par plusieurs points du processus pneumonique classique. On note, en effet, que l'hépatisation n'est jamais complète, qu'il persiste, même lorsqu'elle s'étend à la presque totalité de l'organe, des alvéoles remplis d'air, ou au sein des alvéoles pleins de débris cellulaires, des « trous d'air » qui donnent à la préparation un aspect en dentelle tout particulier. Dans les alvéoles, on rencontre un coagulum fibrineux assez lâche enserrant les cellules desquamées, altérées, et de nombreux polynucléaires, les unes et les autres présentant des altérations de picnose prononcée. Lorsqu'on examine la préparation à l'immersion, on est frappé par l'abondance des débris nucléaires formant des boules polychromes représentant tous les stades d'une dégénérescence caryorexique totale (fig. 5). On ne note habituellement la présence d'aucun germe microbien et les cultures confirment cette constatation. Cependant, dans les cas où l'hépatisation s'est étendue à la totalité de l'organe, et surtout lorsque la mort est tardive, on peut voir des germes d'infection secondaire se développer dans les alvéoles. Il s'agit, le plus souvent, de pneumocoque, parfois d'entérocoque, streptocoque ou B. de Friedländer. Enfin nous avons observé, dans les noyaux des cellules alvéolaires (non pas dans celles qui sont desquamées et qui sont alors atteintes d'une nécrose quasi totale, mais dans celles demeurées en place), spécialement à la périphérie des foyers pneumopathiques, là où le processus est envahissant et où commence l'atteinte des cellules, des inclusions présentant un caractère spécifique que nous n'avons retrouvé dans aucune autre affection pulmonaire du cobaye. Ces inclusions consistent soit en une inclusion centrale acidophile plus ou moins étendue, très comparable dans son aspect aux inclusions de l'herpès ou de la maladie d'Aujeszky (fig. 6 et 7), soit, plus rarement, dans un noyau ayant conservé ses caractères structurels normaux (nucléole, réseau chromatinien, membrane basale), en une inclusion unique, circulaire, se colorant en rouge foncé par la méthode de Mann ou par la méthode fuchsine safranine bleu employée dans notre laboratoire, entourée d'un halo clair, reproduisant de façon curieusement frappante les inclusions de Joest et Degen qu'on observe dans les neurones du cheval au cours de la maladie de Borna. Ces inclusions sont moins fréquentes que les précédentes et doivent être recherchées parfois assez longuement dans la préparation (fig. 8 et 9).

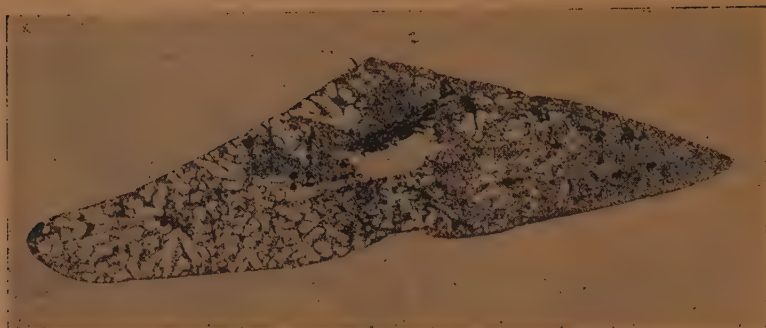


FIG. 3. — Cobaye. Pneumopathie expérimentale. Coupe de poumon typique (huitième jour). Noter le point de départ des lésions à la périphérie de la coupe. (Gross. : $\times 10$.)

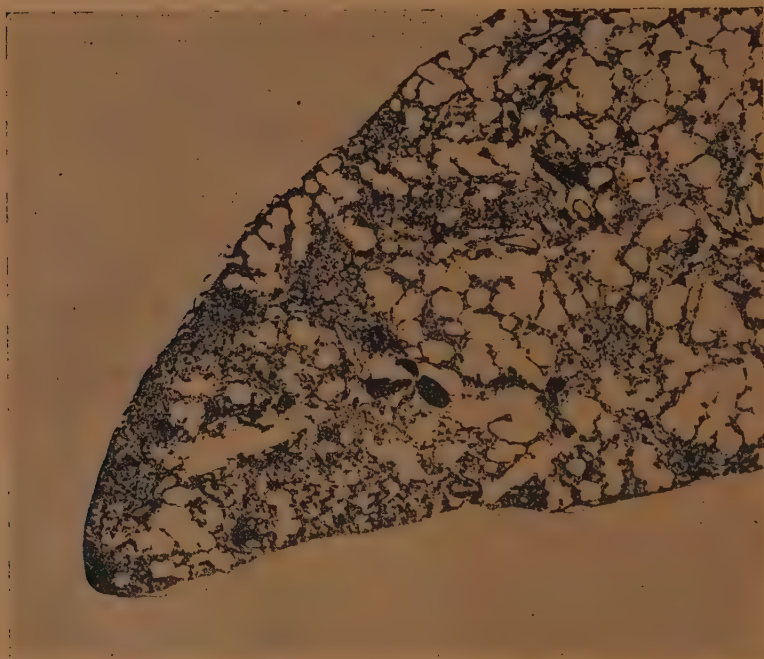


FIG. 4. — Poumon de cobaye dans la pneumopathie expérimentale. Début des lésions pneumopathiques (cinquième jour de l'inoculation) par la pointe du lobe pulmonaire.

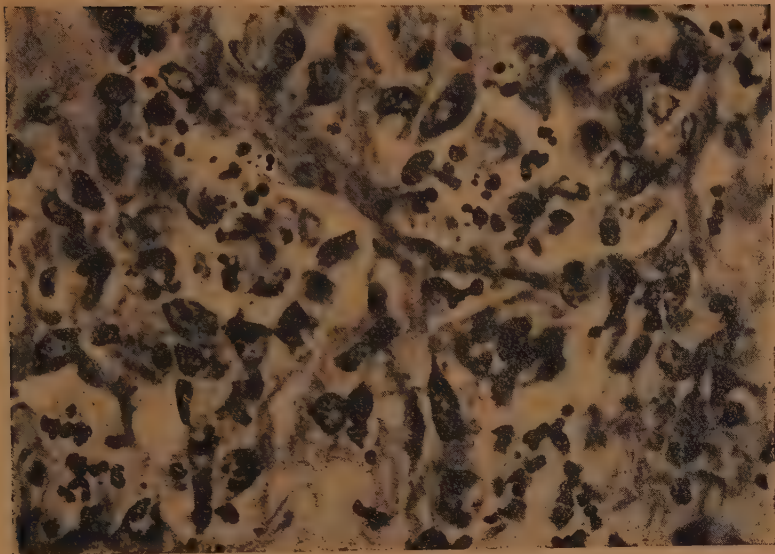


FIG. 5. — Pneumopathie du cobaye. Neuvième jour. Aspect typique des lésions pulmonaires. La structure de l'organe est nettement reconnaissable. La cavité alvéolaire est remplie de cellules desquamées et de polynucléaires plus ou moins picrophobes. (Gross. : $\times 675$.)

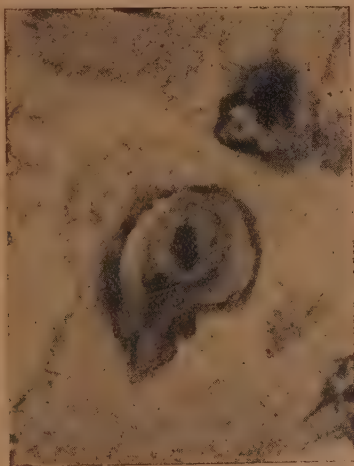
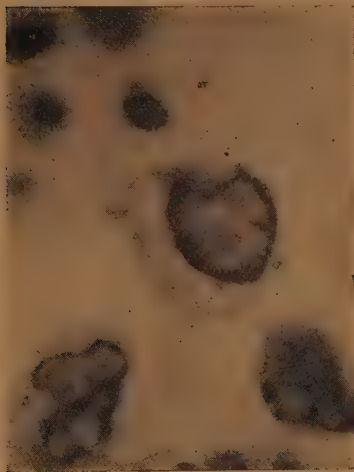


FIG. 6.

FIG. 7.

FIG. 6 et 7. — Pneumopathie. Cellules alvéolaires du poumon présentant des inclusions nucléaires acidophiles du type herpétique. (Gross. : $\times 2.000$.)

Tel quel, l'ensemble des lésions a une allure caractéristique. Une hépatisation dense classique, un processus bronchopneumonique à point de départ péri-bronchial, une infiltration en foyers par des polynucléaires demeurés intacts, l'existence de manchons périvasculaires abondants, toutes images qui s'observent dans d'autres affections pneumoniques du cobaye, doivent immédiatement faire soupçonner qu'on n'a pas affaire au virus de la pneumopathie. En ce cas, on ne trouvera pas les inclusions spécifiques

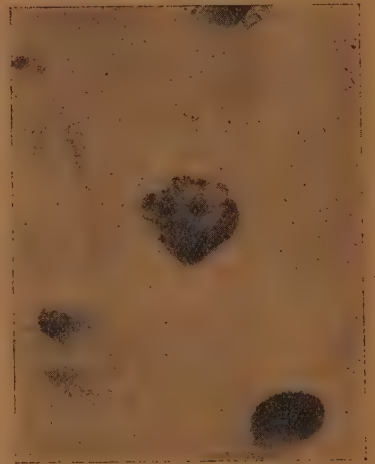
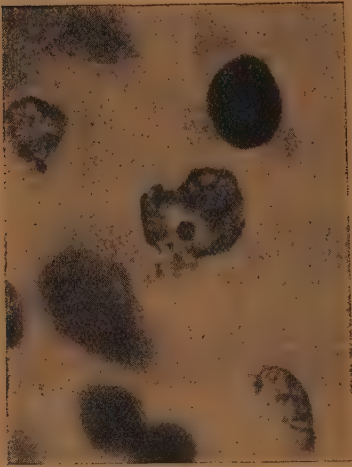


FIG. 8.

FIG. 9.

FIG. 8 et 9. — Pneumopathie expérimentale. Cellules alvéolaires du poumon présentant des inclusions nucléaires du type maladie de Borna. (Gross. : $\times 2.000$.)

et un coup d'œil sur une coupe de la rate au faible grossissement suffira pour confirmer ou infirmer le diagnostic.

2° LÉSIONS DE LA RATE. — Dès le septième jour de l'inoculation apparaissent des lésions spléniques. Elles sont déjà reconnaissables chez les animaux qui meurent à ce stade ; elles sont constantes et typiques chez ceux qui succombent au neuvième et dixième jour.

L'aspect de la rate vue aux faibles grossissements est caractéristique (fig. 10). Au lieu d'avoir sous les yeux le tissu splénique normal du cobaye, caractérisé par les follicules malpighiens généralement circulaires, se fondant insensiblement dans des cordons de Billroth peu marqués, on ne voit dans le champ du microscope que quelques follicules réduits à leur masse centrale sombre, de petite taille et de forme irrégulière, aux limites tranchées les

faisant contraster de façon saisissante avec des espaces lacunaires démesurément agrandis, dont on peut, même aux faibles grossissements se rendre compte qu'ils sont en grande partie désertés par les cellules. L'ensemble de la préparation donne l'impression, non plus d'un tissu homogène, mais d'insertions de forme irrégulière, de tissu lymphoïde très foncé, inclus dans un tissu lacunaire de teinte générale pâle. Aux plus forts grossissements, on constate que les follicules malpighiens et leur centre germinatif, là où il per-

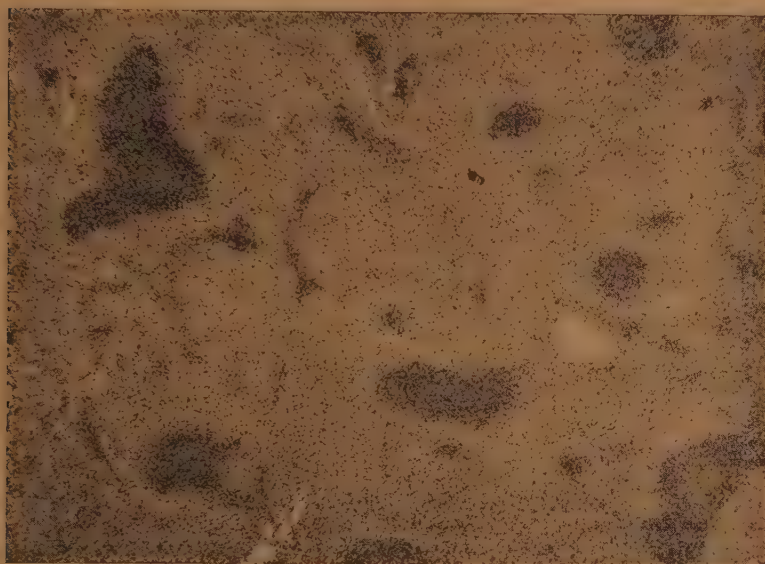


FIG. 10. — Pneumopathie du cobaye. Maladie typique. Neuvième jour. Aspect d'une coupe de rate à faible grossissement. Noter la petite taille et la forme irrégulière des follicules malpighiens, qui tranche nettement sur le parenchyme splénique où la densité cellulaire est considérablement réduite. (Gross. : 40.)

siste, ont conservé une structure normale, quoique limitée en étendue et de forme irrégulière (le plus souvent conditionnée par le système vasculaire) s'arrêtant brusquement à la périphérie où l'on passe presque sans transition aux espaces sinusaux à peu près totalement atrésiés et renfermant autour de polynucléaires de nombreux débris d'érythrocytes ainsi que des amas de pigments sanguins.

Nous n'avons pas observé dans la rate d'inclusions cellulaires comparables à celles qui ont été rencontrées dans le poumon.

3° EVOLUTION DE LA FORMULE SANGUINE. — L'existence de lésions

spléniques aussi tranchées, aussi caractéristiques, pouvait faire penser à celle d'un syndrome hématologique accompagnant l'évolution de la pneumopathie spécifique. Pour élucider ce point, nous avons examiné quotidiennement, depuis le moment de l'inoculation jusqu'à la mort, la numération de la formule sanguine de 12 cobayes reconnus normaux à cet égard pendant une période préliminaire d'observation de vingt jours. Ni le nombre des leucocytes, ni celui des érythrocytes n'ont, chez ces animaux, présenté de modifications caractéristiques au cours de la pneumopathie. Il n'en est pas de même en ce qui concerne la formule sanguine. Nous résumons dans le tableau ci-dessous la moyenne des examens des 12 animaux.

Moyenne des examens de 12 cobayes.

	POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES	LYMPHOCYTES	GRANDS MONONUCLEAIRES	ÉOSINOPHILES	BASOPHILES	FORMES de transition	CELLULES de Turk
Avant inoculation	35	57	4,1	2,7	0,9	0,3	
2 ^e jour	51	43	2,6	1,3	1,5		
3 ^e jour	62	32,6	3,8	0,4	1,2		
4 ^e jour	69,8	23,8	5,2	0,4	0,6		0,2
5 ^e jour	81,5	13	4	0,25	1	0,25	
6 ^e jour	82,5	12	4,5	2	0,8		
7 ^e jour (1)	83,5	13,2	2,75		0,3	0,25	
8 ^e jour (2)	84,9	9,3	4,8		1		
9 ^e jour (3)	59,5	25,75	13,25	0,25	0,25	1	
<i>Moyenne des examens faits à l'agonie les 7^e, 8^e et 9^e jours.</i>							
	51	34,2	12	1,6	0,6	0,6	

(1) Moins 2 animaux agonisants.
 (2) Moins 2 animaux agonisants.
 (3) Tous agonisants.

On remarque que, tandis que les éosinophiles et basophiles ne présentent pas de modifications caractéristiques, on assiste, pendant l'évolution de la maladie, à une diminution progressive du pourcentage des lymphocytes, avec augmentation relative de celui des grands mononucléaires. Mais ce sont les variations des polynucléaires neutrophiles qui sont les plus caractéristiques. On en voit le pourcentage augmenter régulièrement depuis le moment de l'inoculation pour décroître à la fin de la maladie et au moment de la période agonique. La superposition, pour un animal donné, de la courbe thermique et de celle du pourcentage des polynucléaires est à ce sujet particulièrement frappante (fig. 11).

Sans vouloir assigner à ce symptôme une valeur spécifique pour le diagnostic de la pneumopathie des cobayes, notons qu'il n'est pas conditionné par la fièvre seulement et que nous ne l'avons pas observé dans d'autres affections pulmonaires du cobaye, telles que les pneumonies banales ou la chorioméningite lymphocytaire.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DE LA PNEUMOPATHIE DES COBAYES.
AUTRES MALADIES A VIRUS DU COBAYE.

Nous avons donc affaire à une maladie du cobaye nettement ca-

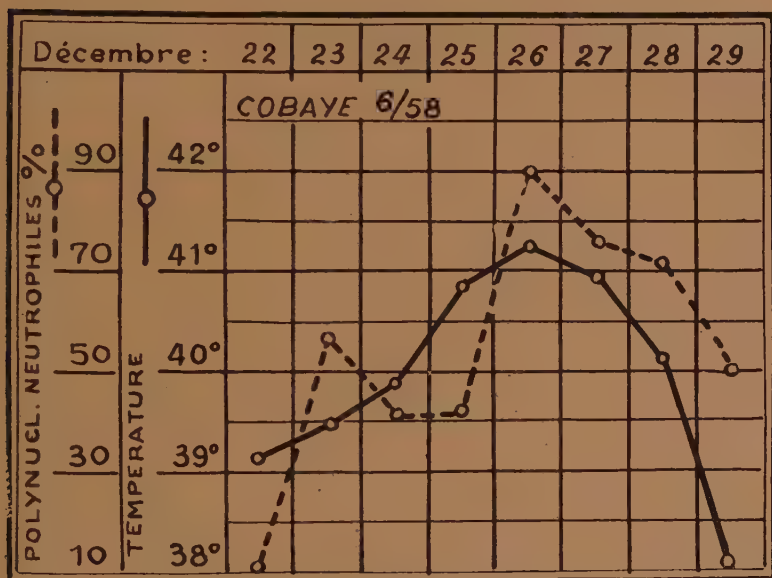


FIG. 11. — Cobaye. Pneumopathie expérimentale. Maladie typique. Parallélisme de la courbe thermique et du pourcentage des polynucléaires neutrophiles dans le sang.

ractérisée : affection constamment mortelle vers le dixième jour de l'infection, avec émaciation et pneumopathie, lésions histologiques de la rate et du poumon. Les différents symptômes, et particulièrement l'examen anatomo-pathologique, permettent d'en faire le diagnostic positif. Comment s'en présente le diagnostic différentiel ?

L'affection que nous avons observée pourrait être confondue soit avec d'autres maladies spontanées du cobaye, soit avec des maladies d'autres animaux capables d'atteindre le cobaye.

1° MALADIES À VIRUS DU COBAYE. — Les maladies à virus du cobayes jusqu'ici décrites sont peu nombreuses [2].

a) Petri et O'Brien [3] n'ont laissé qu'une description très imprécise de la maladie à caractère septicémique due à un ultravirus associé à une *Salmonelle* qu'ils ont décrite en 1910. L'affection ne semble pas avoir été retrouvée depuis ; sa symptomatologie est nettement différente de la pneumopathie.

b) La *maladie de Römer* [4] est caractérisée par une longue incubation (neuf à vingt-trois jours), des paralysies flasques évoluant en dix à quinze jours. L'anatomie pathologique montre qu'il s'agit d'une méningo-myélite.

c) La maladie que Gasperi et Sangiorgi [5] ont décrite sous le nom de « peste des cobayes à virus filtrant » présente une symptomatologie tout à fait analogue à celle de la maladie de Römer, mais avec une mortalité plus élevée, pouvant atteindre 100 p. 100. Le virus, qui siège dans le névraxe et ne se trouve dans le sang que pendant peu de temps après l'inoculation, est très résistant, caractère que ne possède pas, comme on le verra dans notre prochain mémoire, le virus que nous avons isolé.

d) Jonesco-Mihaiesti [6] a décrit en 1921 une maladie présentant un certain nombre de caractères qui la rapprochent de celle que nous avons observée. Elle a été trouvée, comme la nôtre, à titre d'infection intercurrente au cours d'expériences portant sur un autre sujet. Précédée d'une incubation de sept à huit jours, réduite au cours des passages à quarante-huit heures, elle est caractérisée par une période fébrile, sans autre manifestation, durant cinq à sept jours, se terminant par la mort, l'animal étant très amaigri. Toutefois, plusieurs symptômes différencient nettement cette maladie de la pneumopathie que nous avons décrite. A l'autopsie, on observe chez les animaux un foie dégénéré présentant des foyers de nécrose blanchâtre, une hypertrophie des ganglions lymphatiques ainsi que des surrénales, qui peuvent atteindre une taille énorme. Il y a, en outre, de la congestion du névraxe. Tous ces symptômes sont absents de nos observations. Par contre, Jonesco-Mihaiesti ne dit rien du symptôme constant chez nos cobayes : la pneumopathie, ni des lésions microscopiques si caractéristiques du poumon et de la rate. En outre, le virus isolé par Jonesco-Mihaiesti, appartient à la catégorie des virus résistants, puisque, sous forme d'émulsion cérébrale placée en ampoules scellées, il se conserve quatre mois à la température du laboratoire sans perte apparente de virulence, caractère qui tranche nettement avec la fragilité du virus que nous avons isolé. Nous devons donc en conclure que les deux affections sont dues à des agents différents.

2° AUTRES MALADIES SUSCEPTIBLES D'ATTEINDRE LE COBAYE. —

Nous éliminons bien entendu d'emblée les affections dues à des germes visibles susceptibles d'atteindre le cobaye et de déterminer chez lui une maladie mortelle avec des symptômes pulmonaires ; mais il est des maladies à virus, transmissibles au cobaye avec des manifestations pneumopathiques.

La *chorioméningite lymphocytaire* (ou C.M.L.) est celle à laquelle il faut évidemment penser en premier lieu. Nous avons eu à en faire le diagnostic, d'autant plus que dans notre laboratoire même des souches de C.M.L. étaient régulièrement entretenues sur le cobaye dont le poumon hépatisé nous sert à préparer l'antigène pour les déviations de complément en vue du diagnostic de cette affection [7]. Cliniquement, le diagnostic n'est pas aisé à faire. Notons cependant que, dans la C.M.L., l'incubation chez le cobaye est extrêmement courte, ne dépassant pratiquement jamais quarante-huit heures, alors que dans la pneumopathie ce délai correspond, au contraire, aux incubations les plus courtes. Histologiquement, par contre, le diagnostic est facile. L'aspect de la pneumopathie de la C.M.L. est différent ; il a été décrit dans la thèse de notre élève B. Kreis [8], nous n'y reviendrons pas. Mais surtout on n'observe pas, dans la C.M.L., les lésions de la rate si caractéristiques de la pneumopathie ; nous nous en sommes assurés, non seulement en effectuant des passages sur des cobayes pour préciser au stade *actuel* d'évolution de notre virus cet important caractère différentiel, mais encore en vérifiant dans notre collection histologique, qui comporte un très grand nombre de blocs de C.M.L. depuis 1936, qu'à aucun moment de son entretien sur cobaye, la souche de C.M.L. n'a donné de lésions spléniques comparables à celles qui sont constantes dans la pneumopathie. Enfin, les essais de transmission à l'animal nous ont montré que le virus de la pneumopathie ne détermine pas d'affection régulièrement mortelle chez la souris, alors que notre virus de C.M.L., primitivement originaire de la souris, a conservé intégralement toute sa virulence pour cette espèce animale, même lorsqu'il s'agit de souches entretenues depuis des années sur cobaye.

Nous avons vérifié par ailleurs que ni le *louping-ill*, ni la *maladie d'Aujeszky*, ni aucun virus entretenu dans notre laboratoire et susceptible d'atteindre le cobaye, ne pouvaient déterminer de lésions comparables à celles de la pneumopathie.

VIRULENCE DES DIFFÉRENTS ORGANES.

La comparaison de la virulence des différents organes au cours de la pneumopathie des cobayes montre :

1° Que tous les organes présentent un taux de virulence très élevé et sensiblement égal d'un organe à l'autre.

2° Que c'est à la présence du sang qu'il faut attribuer cette virulence.

En prenant pour source de virus l'encéphale prélevé chez le cobaye au moment de la mort, les expériences nous ont montré une virulence constante de l'émulsion cérébrale diluée à 10^{-5} ; les émulsions à 5.10^{-5} tuent un cobaye sur deux; l'émulsion au millionième n'est habituellement pas virulente. En prenant pour source de virus le foie, la rate ou les émulsions d'un de ces organes, on constate que la virulence est constante pour les émulsions diluées à 5.10^{-5} ; les émulsions à 10^{-6} tuent une fois sur deux; l'émulsion à 5.10^{-6} n'est plus virulente.

L'étude de la virulence du sang montre que ce dernier ne renferme pas de virus les deuxième et troisième jours de l'inoculation, devient constamment virulent dès le quatrième jour. Le taux de virulence ne dépasse pas alors habituellement 10^{-2} , si l'on prend pour test de la virulence l'injection intracérébrale de 0,1 cc. de la dilution de sang, ou 10^{-3} si l'on prend pour test l'injection sous-cutanée de 0,25 cc. de la même dilution. A partir du cinquième jour, le sang est virulent au moins jusqu'à 10^{-4} et conserve au minimum ce taux de virulence qu'on retrouve dans le sang prélevé peu après la mort.

Si l'on compare la virulence du sang à la courbe thermique, on voit que l'apparition du virus dans le sang précède de quelques heures l'élévation de la température, tout en montant parallèlement à cette dernière.

Ces différents caractères, tirés de la virulence du sang et des organes, montrent que le virus auquel nous avons affaire fait partie de la catégorie des virus septicémiques, agents des maladies généralement désignées sous le nom de pestes animales. Aussi le nom de « peste des cobayes » eût-il semblé le plus indiqué pour désigner l'affection que nous avons décrite si ce mot n'avait déjà eu l'antériorité pour désigner une autre affection, la maladie de Römer-Gasperi-Sangiorgi.

ESPÈCES ANIMALES SENSIBLES.

Nous avons cherché à transmettre le virus de la pneumopathie des cobayes à d'autres animaux de laboratoire. Nos essais ont échoué et jusqu'ici, en dehors du cobaye, nous n'avons trouvé aucune espèce animale qui soit réellement sensible au virus.

SOURIS. — Des lots de souris ont été inoculés avec des émulsions virulentes par voies sous-cutanée, intramusculaire et intranasale. Ces expériences sont restées, dans leur ensemble, négatives. Signalons seulement celles qui ont pu donner lieu à des interprétations discutables.

1° Trois souris suisses sont inoculées par voie sous-cutanée le 18 mai 1943 et survivent sans présenter aucun trouble. L'une d'elles est sacrifiée le dix-huitième jour. Un mélange de foie, rate et poumon de cette sou-

ris est inoculé à 2 cobayes : l'un d'eux succombe le dixième jour avec des lésions typiques, l'autre survit. Mais la répétition de cette expérience donne à plusieurs reprises des résultats négatifs.

2° Deux souris sont inoculées par voie intranasale avec une émulsion virulente le même jour (18 mai). L'une succombe le dixième jour, l'autre le onzième jour. Toutes deux présentent des lésions pulmonaires broncho-pneumoniques avec présence de pneumocoques, mais pas de lésions spléniques ; les passages de foie et rate sur cobayes sont positifs. Par contre, 4 souris inoculées de même par voie nasale le 17 août, ne présentent rien de particulier ; sacrifiées, elles ne présentent aucune lésion ; leurs passages sont négatifs.

Il semble certain que, dans le premier des cas, la transmission à la souris par voie sous-cutanée soit négative. Nombre d'expériences dans ce sens s'opposent en effet à l'expérience unique rapportée ci-dessus. Il est vraisemblable que le seul cobaye qui ait pris avec le matériel inoculé était lui-même en état d'incubation de pneumopathie et que l'inoculation aura joué le rôle déclenchant.

En ce qui concerne les expériences réalisées par voie nasale, il est plus difficile de les interpréter. Il se pourrait que l'inoculation nasale soit capable de déterminer chez la souris des lésions broncho-pulmonaires renfermant le virus. Mais d'autres essais sont demeurés totalement négatifs. Ces expériences seront complétées aussitôt que possible.

RAT. — Toutes les expériences faites avec des rats inoculés par voies sous-cutanée, intracérébrale ou intrapéritonéale, sont demeurées négatives. Par contre, les animaux inoculés par voie nasale ont donné, comme chez les souris, des résultats d'interprétation douteuse. En voici un.

Quatre rats sont inoculés le 18 mars 1943 par voie nasale avec une suspension virulente (émulsion 10^{-2} de foie virulent de cobaye). Deux d'entre eux ne présentent aucun symptôme, l'examen de leurs organes est négatif. L'un d'eux, sacrifié le seizième jour, présente des lésions histologiques pulmonaires très faibles du type broncho-pneumonique. Passages de foie et rate sur deux cobayes, négatifs. Le dernier, sacrifié le dix-huitième jour, présente des lésions histologiques rappelant celles d'aspect typique du cobaye. Passage du poumon sur le cobaye avec résultat positif. Par contre, quatre autres rats, inoculés par voie nasale, ne présentent rien de particulier ; le passage de leurs organes à des cobayes ne donne pas de résultats concluants, ceux-ci étant morts prématurément, mais n'ayant toutefois rien présenté dans les délais de l'incubation (4).

(4) *Addendum*. Depuis la rédaction de ce mémoire nous avons obtenu la transmission de notre virus au rat, et son adaptation à cette espèce animale. Ces expériences seront rapportées dans le deuxième mémoire (janvier 1945).

LAPIN. — Les lapins inoculés par voie cérébrale et par voie cutanée ne présentent ni symptômes pathologiques, ni lésions pendant quarante jours d'observation.

Un furet, un chat, un hérisson, inoculés par voie nasale, ont survécu sans présenter aucun symptôme particulier.

CONTAMINATION PAR VOIE NASALE.

Ayant en vue la recherche du mode de contamination des cobayes spontanément infectés, nous avons essayé leur sensibilité par voie nasale. Pour ce faire, les animaux ont reçu en instillation dans chaque narine, une goutte d'une suspension virulente avec anesthésie préalable à l'éther. Dans tous les cas, les animaux ont contracté une pneumopathie typique après une incubation de courte durée et sont morts dans les délais normaux, leurs organes présentant des lésions, particulièrement intenses dans le poumon. Dans cet organe on notait qu'à la différence des infections observées à la suite de la contamination par d'autres voies, le point de départ des lésions observées se trouvait autour des ramifications bronchiques et qu'il présentait un cours centrifuge allant du centre de l'arborisation pulmonaire vers la périphérie de la plèvre. L'infection est, en règle générale, plus dense et plus étendue avec ce mode de contamination que lorsque le produit virulent a été administré par les autres voies.

ESSAIS DE CONTAMINATION DE CAGE.

Nous avons cherché à déterminer par cohabitation la contamination de nos animaux, pour élucider dans la mesure du possible le mode normal d'infection des cobayes. Les expériences réalisées à cet égard sont assez suggestives.

Nous avons placé dans des cages côte à côte des cobayes inoculés pour les passages ordinaires de notre virus et des cobayes neufs. Aussitôt que les cobayes atteints de pneumopathie succombaient, ils étaient remplacés par d'autres animaux inoculés. Plusieurs animaux inoculés étaient placés en même temps qu'un seul cobaye neuf, de manière à ce que ce dernier soit constamment en contact avec des cobayes aux différents stades de la maladie. Dans ces conditions, les résultats observés ont été entièrement différents, selon que nous avons fait appel pour nos animaux neufs à des cobayes ayant déjà séjourné dans l'Institut Pasteur ou à des animaux en provenance d'autres élevages.

1° Avec les animaux du stock de l'Institut Pasteur. Ce sont des animaux provenant de l'Institut Pasteur de Garches, ayant servi à des titrages de toxine et séjourné assez longtemps dans les stocks de l'Institut Pasteur de Paris. Deux animaux sont placés dans deux cages de contamination renfermant chacune plusieurs animaux malades. La température est prise journallement. Le con-

tact est poursuivi pendant trente-cinq jours. Les animaux survivent sans présenter aucun mouvement fébrile. Eprouvés à la suite de cette expérience, les deux animaux succombent le douzième jour avec des lésions typiques.

2° Animaux en provenance d'élevages étrangers. Il s'agit d'animaux expédiés à l'Institut Pasteur par un élevage rural. Les animaux prélevés pour nos expériences étaient reçus directement et passés dans notre Service sans avoir séjourné dans le stock de l'Institut Pasteur.

a) Le 30 octobre 1943, le cobaye neuf 340 est mis dans une cage de contamination. Le treizième jour il présente une élévation thermique : 40°4. Le quatorzième jour la température est de 41°1. Le sang prélevé au cœur par ponction se montre hautement virulent. L'animal succombe le dix-septième jour avec des lésions typiques du poumon et de la rate particulièrement intenses.

b) Un autre cobaye neuf, n° 339, est placé dans la même cage de contamination. Le quinzième jour, il présente un crochet thermique à 40°7. Le sang prélevé au cœur par ponction et inoculé à d'autres cobayes ne se montre pas virulent. L'animal succombe d'infection intercurrente au bout de cent cinq jours, sans présenter de lésions caractéristiques.

CULTURE SUR MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDE.

Nous avons cherché à cultiver le virus de la pneumopathie des cobayes dans l'œuf de poule en voie de développement, en employant pour l'inoculation la méthode aujourd'hui classique de Goodpasture et Buddingh. Des membranes prélevées cinq et six jours après l'inoculation ne présentent pas de lésions macroscopiques. A l'examen histologique, on ne rencontre que des lésions banales sans caractères spécifiques, et inconstantes. Néanmoins, l'inoculation des membranes à l'animal montre que, non seulement le virus a survécu, mais qu'il s'est multiplié de façon appréciable. Des membranes inoculées avec une suspension de cerveau virulent, diluée à la limite de la virulence (0,1 cc.), présentent, lors de l'ouverture de l'œuf, une virulence telle que les membranes broyées et diluées à 10^{-5} déterminent à coup sûr une maladie mortelle chez le cobaye dans les délais réguliers. Des passages de membrane à membrane ont été aisément réalisés. C'est le sixième jour que la virulence de l'œuf atteint son maximum. La virulence des membranes est attestée par la violence de l'infection chez l'animal, qui succombe parfois dès le septième jour. Nous avons réalisé 14 passages d'œuf à œuf (5) ; au quatorzième passage,

(5) M. Louis REINÉ, préparateur du service, nous a apporté son concours technique et a effectué tous les passages d'œuf à œuf, en plusieurs séries parallèles jusqu'à la fin des expériences.

la virulence des membranes n'avait pas fléchi et se situait entre 10^{-5} et 10^{-6} . Seuls les incidents, dus aux circonstances actuelles, ayant entraîné l'arrêt des étuves à incubation, nous ont empêchés de poursuivre plus avant les passages sur membrane chorio-allantoïde.

CONCLUSION.

Nos expériences ont porté sur une maladie spontanée du cobaye, qui n'avait pas été observée jusqu'ici. Nous en avons fait l'étude expérimentale, et décrit les symptômes et les lésions. Cette maladie est due à un ultravirus que nous avons isolé : l'étude de ce dernier fera l'objet d'un second mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.), SAUTTER (V.) et LAMY (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 317.
- [2] LÉPINE (Cf. P.). *Maladies du cobaye*, in LEVADITI (C.) et LÉPINE (P.). *Les Ultravirus des Maladies animales*, Maloine, édit., Paris, 1943, 926.
- [3] PETRI et O'BRIEN. *J. Hyg.*, 1910, **10**, 287.
- [4] RÖMER (P. H.) et JOSEPH (K.). *Münch. med. Wochenschr.*, 1910, n° 51, 2685 ; *Römer. Deut. med. Wochenschr.*, 1911, **37**, 209.
- [5] DE GASPERI (F.) et SANGIORGI (G.). *Zentralbl. Bakt.*, 1913, **71**, 257.
- [6] JONESCO-MIHAILESCU. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 1015.
- [7] LÉPINE (P.), MOLLARET (P.) et SAUTTER (V.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 925.
- [8] KREIS (B.). *La Maladie d'Armstrong, chorio-méningite lymphocytaire*, Thèse de Médecine, J.-B. Baillièrre et fils, édit. Paris, 1937.

ETUDE OPTIQUE DE LA FORME GÉOMETRIQUE DE QUELQUES BACTÉRIES (1)

(DEUXIÈME PARTIE)

par MARCEL GUILLOT

(Hôpital Broussais. Laboratoire de la Pharmacie.)

Diffraction de la lumière et symétrie de la bactérie.

I. LE PHÉNOMÈNE D'IRISATION DES CULTURES SUR GÉLOSE. — Un grand nombre de germes, cultivés sur gélose inclinée, présentent, à certains moments du développement des cultures, un aspect irisé (groupe typhique et paratyphique, proteus, staphylocoque, streptocoque, etc.). Ce caractère est noté parfois, par les systématiciens comme un caractère différentiel. Il semble, dans quelques cas, avoir donné lieu à des confusions avec la fluorescence. Eclairées d'une certaine manière, les cultures irisées montrent des reflets colorés assez analogues à ceux qu'on observe sur des cultures fluorescentes. La distinction est évidemment très simple : une culture fluorescente est lumineuse en lumière de Wood, et, en lumière blanche, les reflets colorés qu'elle présente ne changent pas de teinte quand on déplace la culture par rapport à la source lumineuse. Au contraire, les vives couleurs d'une culture irisée disparaissent en lumière de Wood. On les observe surtout quand on se place, dans une pièce sombre, devant une lampe électrique située à hauteur des yeux et quand on déplace de *haut en bas* la culture, entre la source lumineuse et l'œil de l'observateur. On voit alors, suivant l'angle d'incidence de la lumière, la culture passer par toutes les couleurs du spectre, du violet bleu au rouge pourpre en passant par le bleu, le vert et l'orangé. Ce phénomène est sans rapport avec la production de *pigments* par certains germes. Dans ce dernier cas, en effet, la coloration observée reste la même, quelle que soit l'incidence de la lumière.

II. CONDITIONS DE CULTURE FAVORABLES AU DÉVELOPPEMENT DE L'IRISATION. — Ces conditions sont variables d'un germe à l'autre. Les streptocoques paraissent particulièrement aptes à donner des

(1) Ces *Annales*, 1945, 71, 18.

cultures irisées. En général, dès que les cultures commencent à être visibles à l'œil nu, elles sont irisées. Et elles le restent très longtemps, même si la culture est conservée à l'étuve plusieurs semaines.

Le phénomène est moins général avec les staphylocoques ou les bactéries du groupe typhique ; il n'apparaît alors que dans certaines conditions, mais il est susceptible de prendre parfois une très grande intensité et une parfaite régularité. C'est la raison pour laquelle je me suis borné à l'observer dans ces cas particuliers. Une souche de staphylocoque jaune ancienne fournit, par un premier repiquage sur gélose inclinée, une culture en colonies discrètes bien délimitées, sans trace d'irisation. Si au bout de vingt-quatre heures on repique cette culture, la deuxième culture de vingt-quatre heures se montre encore formée de colonies distinctes pour la plupart, quelques-unes seulement étant confluentes. L'irisation est encore nulle. Un troisième repiquage fournit après vingt-quatre heures une culture en colonies confluentes faiblement irisées. En repiquant régulièrement de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures on obtient, après quelques jours, des cultures en tapis homogène, sans trace de colonies isolées, surtout si chaque ensemencement est fait largement, avec une forte dose de culture. La culture finale est translucide et intensément irisée. Nous avons vu, dans la première partie, qu'elle était composée de cocci isolés. Le phénomène d'irisation observé indique que tous ces cocci ont, à très peu de chose près, le même diamètre. Chacun d'eux provoque en effet une diffraction de la lumière par interférence des ondes réfléchies par ses bords opposés.

Le diamètre de la bactérie joue donc un rôle dans le phénomène ; ce rôle est le même que celui de l'intervalle de deux raies voisines d'un réseau optique. Et, pour qu'on observe un phénomène macroscopique, il faut qu'il y ait identité de direction privilégiée de la lumière diffractée par la majorité des bactéries, c'est-à-dire identité des diamètres. On peut donc dire que le phénomène apparaît quand la culture est composée d'individus ayant presque tous exactement le même diamètre, ce qui est le cas ici de ces cocci isolés.

Les mêmes conditions de culture conviennent aux bactéries du groupe typhique. Avec *B. typhosum* on obtient dès le premier repiquage une culture irisée faiblement. L'intensité du phénomène augmente à chaque repiquage, en même temps que la culture prend l'aspect d'un tapis uniforme translucide. L'examen microscopique, après coloration, ou directement, à l'ultra-microscope, montre bien qu'à mesure que l'irisation s'intensifie, l'homogénéité en largeur s'accroît, en même temps que la longueur s'uniformise également.

Avec des souches de paratyphiques A ou B, on obtient des résultats analogues mais inférieurs. Il faut un nombre plus grand

de repiquages successifs, à vingt-quatre heures d'intervalle, pour obtenir le meilleur résultat. Et l'homogénéité *en longueur* n'est pas aussi complète qu'avec *B. typhosum*. Enfin le *B. coli*, suivant les souches, peut parfois donner lieu à cette irisation, faiblement, et après un grand nombre de repiquages. Mais la plupart des souches de ce germe ne fournissent, même après un nombre très grand de repiquages, aucun phénomène d'irisation, même légère. Corrélativement, on observe que ces cultures sont très polymorphes, même quand elles sont jeunes, ce qui est un caractère connu du *B. coli* [14]. Il semble donc que l'intensité de l'irisation des cultures soit susceptible de rendre des services, au même titre que les tests biologiques, pour aider à la différenciation du *B. coli* et des bactéries du groupe typhique.

On voit que les conditions de culture les plus favorables pour les germes du groupe typhique tout au moins, sont les mêmes que celles qui développaient au maximum la propriété de produire des ondes moirées.

III. DIFFRACTION DE LA LUMIÈRE BLANCHE PAR UNE CULTURE PRESSÉE ENTRE DEUX PLANS DE VERRE. — Si on récolte, à l'anse de platine, une masse de culture fortement irisée, d'un volume voisin de 1 millimètre cube, si on la dépose au centre d'une plaque de verre épais de grandes dimensions (par exemple $100 \times 100 \times 10$ mm.), et si on recouvre immédiatement par une deuxième plaque de verre identique à la première, on voit la culture s'étaler par compression, en une tache translucide, sensiblement circulaire. Si les deux surfaces de verre sont bien planes et parfaitement propres, on peut facilement les rapprocher jusqu'à ce que, par réflexion, on observe, au pourtour de la tache, des franges de Newton roses et vertes d'ordres supérieurs, très pâles, indiquant que la lame d'air qui avoisine la tache de culture a atteint une épaisseur de 5 à 6 μ . Le dispositif est alors prêt. Il suffit d'envoyer normalement au feuillet plan de la culture un faisceau de lumière blanche parallèle, pour observer latéralement, au delà de la culture, un phénomène de dispersion très marqué. C'est-à-dire que, suivant l'angle d'observation, la culture paraît vivement colorée en violet bleu (au voisinage du faisceau blanc transmis) ou, si on s'écarte davantage, bleu, puis vert, jaune, orangé, rouge et pourpre. On peut encore observer ce « spectre » sur un écran blanc. Le phénomène est de révolution, c'est-à-dire que tout autour du faisceau émergent, les colorations sont les mêmes pour chaque angle d'observation. Autrement dit, le spectre à une disposition conique. Sur un écran parallèle aux plans de verre, on observe un anneau spectral circulaire, bleu violet vers le centre, rouge à la périphérie.

IV. CONTRÔLE DE LA MÉTHODE DE DIFFRACTION PAR APPLICATION

A LA MESURE DU DIAMÈTRE DES HÉMATIES. — Nous avons vu dans la 1^{re} partie (§ IV) qu'un calcul élémentaire permettait de déduire de la mesure des angles de diffraction de la lumière, le diamètre de la bactérie, soit dans le cas où elle est infiniment plate, soit dans le cas où elle est rigoureusement cylindrique et d'indice de réfraction voisin de celui du milieu. En réalité, la valeur du diamètre vrai ne pourrait être calculée d'une manière complète que si on connaissait : 1° la forme exacte de la section droite de la bactérie ; 2° la valeur exacte de son indice de réfraction ; 3° l'existence ou la non-existence d'une membrane, ainsi que l'épaisseur et l'indice de cette dernière. C'est dire que dans la pratique le calcul est impossible.

Mais on peut vérifier la valeur de l'interprétation élémentaire de notre expérience de diffraction en l'effectuant de la même manière et avec le même matériel, mais en remplaçant, entre les deux plans de verre, la goutte de culture microbienne vivante par une goutte de sang humain frais. On est alors ramené à une expérience qui a été faite pour la première fois par Young et qui récemment a été mise au point et appliquée à la mesure pratique du diamètre *moyen* des hématies par Pijper [12].

Comme les hématies sont très plates, nous pouvons négliger leur épaisseur ainsi que leur indice de réfraction. La formule à appliquer est alors, si on se rapporte à la figure 1 :

$$d = \frac{3\lambda}{2 \cos \alpha}$$

dans laquelle d est le diamètre moyen de l'hématie, λ la longueur d'onde de la lumière utilisée, α l'angle indiqué sur la figure.

Les mesures effectuées sur un sang frais, avant le début de coagulation, m'ont donné comme valeur $d = 8,8 \mu$ alors que des mesures directes à l'ultra-microscope, sur le même sang fluide, me donnaient comme valeur moyenne $8,5 \pm 0,5 \mu$. L'accord est donc excellent, l'imprécision de la mesure directe ne permettant pas un contrôle plus serré.

La même expérience faite sur le même sang après étalement et séchage, donne les valeurs $d = 7,1 \mu$ (par diffraction) et $d = 7,0 \pm 0,5 \mu$ (par mesure directe au microscope, en lumière transmise). Cette dernière mesure est très approximative, le séchage après étalement ayant déformé de manière inégale les hématies qui montrent un contour irrégulier au lieu du contour parfaitement circulaire qu'elles avaient à l'état vivant. Le diamètre moyen doit donc être évalué, d'abord pour chaque hématie, par des mesures effectuées dans plusieurs directions et ensuite pour plusieurs hématies différentes.

Quoi qu'il en soit, le dispositif expérimental utilisé et l'interprétation proposée se trouvent ainsi soumis à un contrôle intéressant. Les anneaux de diffraction obtenus avec les hématies sont

de diamètre beaucoup plus petit, évidemment, que ceux qu'on obtient avec les bactéries. En lumière blanche, la dispersion est beaucoup moins grande et la pureté des couleurs beaucoup moins satisfaisante. En dehors du contrôle qu'elle apporte, l'expérience faite sur les hématies a toutefois l'intérêt de montrer directement que la dessiccation altère les formes et fait apparaître des dissemblances d'aspect, même quand tous les individus étaient identiques à l'état vivant.

V. DIFFRACTION APRÈS ORIENTATION. — Nous avons déjà vu, dans la première partie, que, si les deux plans de verre, entre lesquels a été écrasée la bouillie microbienne, viennent à effectuer l'un par rapport à l'autre un mouvement de glissement, les bactéries s'orientent dans la direction du glissement. La bouillie microbienne fait office de lubrifiant, c'est-à-dire que la partie du feuillet liquide adhérente à chacun des deux plans de verre l'accompagne dans son mouvement, tandis que les parties intermédiaires sont soumises à un étirement dans la direction de la translation. Les particules en suspension, en l'espèce les bactéries, ont évidemment tendance, si elles sont allongées, à se disposer dans cette direction d'étirement. De plus, si elles sont plates, parallèlement aux plans de verre. On doit s'attendre à ce que cette orientation entraîne immédiatement une modification dans le phénomène de diffraction. En effet, dès que le mouvement de glissement commence, dans le sens horizontal par exemple, on voit la forme du spectre se modifier. Avec *B. typhosum* comme élément diffractant, la section du cône spectral n'est plus circulaire, mais approximativement elliptique, avec un renforcement d'intensité dans la direction verticale, c'est-à-dire *en haut* et *en bas*. Le grand axe de l'ellipse est *vertical*. Si le germe utilisé est un paratyphique A, le plus souvent, dès que le glissement s'effectue, le spectre ne subsiste que dans la direction verticale (c'est-à-dire dans le plan *normal* à la direction de glissement). A droite et à gauche, le phénomène a disparu.

Comme dans ces phénomènes de diffraction l'angle d'observation du spectre est d'autant *plus grand* que l'élément diffractant est *plus petit*, les apparences qui viennent d'être décrites s'expliquent, dans le cas de bacille typhique, par le fait que les bactéries ont toutes à la fois même longueur et même largeur. Elles se sont orientées, leur *grand axe* dans le sens du mouvement, c'est-à-dire dans la direction horizontale (petit axe du diagramme) et leur *axe transversal* dans la direction verticale (grand axe du diagramme) [fig. 8]. Dans le cas du paratyphique A, les bactéries doivent être de *longueur inégale* mais avoir toutes *même largeur*. Elles s'orientent alors, leur grand axe dans le sens du mouvement, c'est-à-dire dans la direction horizontale (disparition du spectre dans cette direction) et leur axe transversal dans la direction ver-

ticale (deux taches spectrales subsistent, une en haut et une en bas).

Nous avons vu, dans la première partie, que si le mouvement de glissement s'arrête pour reprendre ensuite *en sens inverse*, il se produisait une volte-face des bactéries suivie d'une réorientation. En même temps on observe une sorte d'éclair, provoqué par un effet de réflexion de la lumière par les petits miroirs tournants que forment les bactéries. Pendant le même intervalle de temps, on voit le spectre s'éclipser, pour réapparaître identique à ce qu'il était auparavant. Nous avons vu déjà que ce phéno-



FIG. 8. — Aspect, en lumière monochromatique, de la figure de diffraction obtenue avec *B. typhosum* (dessin).

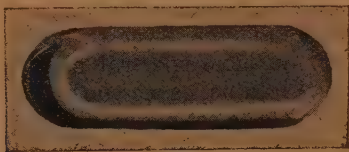


FIG. 9. — Photographie d'un modèle, en matière plastique transparente, de bactérie plate (épaisseur égale à la moitié de la largeur).

mène est particulièrement marqué quand la suspension des bactéries est le siège d'ondes moirées intenses, c'est-à-dire quand les bactéries sont plates.

L'expérience est plus nette encore quand on opère avec la lumière monochromatique. On observe alors, sur un écran normal au faisceau émergent, dans le cas du bacille typhique, un anneau lumineux grossièrement elliptique, d'intensité renforcée aux extrémités du grand axe et à un degré moindre du petit axe (fig. 8). Dans le cas du paratyphique A, deux taches seulement, dans la direction verticale.

VI. DIFFRACTION ET SYMÉTRIE DE LA BACTÉRIE. — On peut dire que cette expérience de diffraction après orientation renseigne à

la fois sur l'homogénéité de la culture (apparition d'un phénomène de diffraction, en accord pour toutes les bactéries dans le cas seulement où elles ont *une au moins* de leurs dimensions commun) et sur la symétrie de la bactérie. En effet, les éléments de symétrie de la bactérie se retrouvent dans le diagramme, de sorte que le seul examen de ce dernier permet de connaître les premiers.

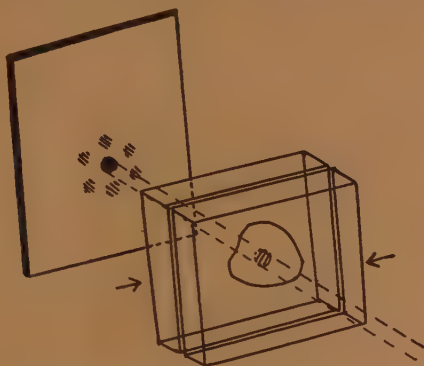


FIG. 10. — Disposition schématique de l'expérience de diffraction par la culture orientée.

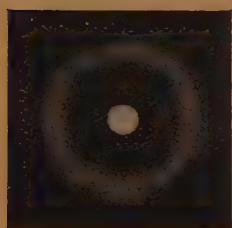


FIG. 11.



FIG. 12.

FIG. 11. — Aspect de la figure de diffraction obtenue en lumière monochromatique, avec une culture de *Staphylococcus citreus*, en cocci isolés sans orientation, ou après orientation en position IV ou V de la figure 17 (dessin).

FIG. 12. — Aspect de la figure de diffraction obtenue en lumière monochromatique, avec la même culture que figure 11, après orientation, par glissement, en position II, figure 16 (dessin).

A une *figure spectrale à symétrie binaire*, dans deux directions, correspond évidemment une *bactérie à symétrie binaire* dans deux directions aussi.

On pourrait penser qu'en réalité ce type de symétrie soit le seul qui puisse être rencontré, ici une symétrie d'ordre plus élevé étant *a priori* inattendue. Mais la même expérience réalisée avec

le staphylocoque montre le contraire. Si on utilise une culture de staphylocoque quelconque, on n'observe aucun phénomène. Si la culture a été obtenue par repiquages successifs, selon la technique indiquée déjà et si elle se montre, à l'examen microscopique, for-



FIG. 13. — Photographie de la figure de diffraction schématisée par la figure 12. La source de lumière utilisée est ici l'arc au mercure, sans filtre. Les radiations utiles sont les radiations violette de 4.359 \AA , et verte de 5.461 \AA . On voit donc sur la photographie six taches *intérieures*, autour de la tache centrale, qui correspondent à la radiation violette, et six taches *extérieures*, correspondant à la radiation verte. Malheureusement la photographie n'a pas pu être faite instantanément *pendant* le glissement, mais seulement aussitôt après. L'agitation brownienne a détruit partiellement l'orientation, pendant la pose, et le phénomène a perdu de sa netteté.

mée uniquement de cocci isolés, on obtient, dans l'expérience de diffraction sans orientation, un cône spectral de révolution, comme avec le bacille typhique. Mais si on réalise le glissement des plans de verre dans une direction horizontale parfaitement régulière, on voit le spectre augmenter d'intensité en six points, dont deux en direction verticale. Pendant tout le glissement, l'anneau circulaire se trouve donc remplacé par six *taches* situées aux sommets d'un hexagone régulier *dressé sur un de ses sommets* (fig. 12). Si le glissement s'arrête, pour reprendre ensuite en sens inverse, les six

taches diminuent d'intensité pendant le court temps d'arrêt et réapparaissent, sans changement de position, dès que le mouvement en sens inverse commence.

Mais, ce qui est très remarquable, si, au moment où le glissement cesse, on soulève très légèrement un des plans de verre, c'est-à-dire si on effectue un glissement imperceptible en direction non plus horizontale, mais verticale, on voit d'un seul coup *l'ensemble des six taches tourner autour de son centre*, puis s'évanouir, l'anneau continu réapparaissant (fig. 11) pour une seule position relative des plans de verre. Si le mouvement de bas

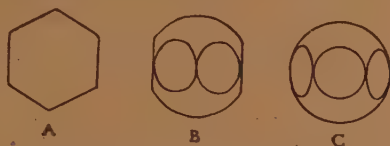


FIG. 14. — Aspect du modèle proposé de Staphylocoque, en projections sur trois plans orthogonaux.

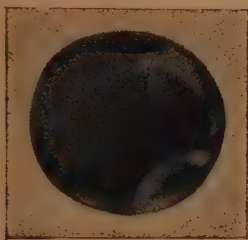


FIG. 15. — Photographie d'un modèle en matière plastique transparente, montrant la forme géométrique attribuée au Staphylocoque.

en haut continue, les six taches se reforment, orientées d'autre manière, car cette fois l'hexagone repose non plus sur un de ses sommets mais sur un de ses côtés.

L'interprétation de ces apparences est beaucoup plus délicate que celle de l'expérience précédente. L'analogie des conditions expérimentales oblige à conclure que la bactérie s'est orientée de telle manière que son contour apparent a une symétrie hexagonale, ce qui ne peut être réalisé que si le coccus a la forme d'une sphère qu'on aurait coupée par six plans pour en détacher six calottes sphériques, centrées sur les axes d'un hexagone régulier.

Autrement dit, chaque coccus aurait l'aspect d'un sphéroïde à six pans, présentant dans ses différentes positions les aspects indiqués dans la figure 14. Un modèle en verre organique plexiglass a été réalisé et photographié (fig. 15).

VII. DIFFRACTION ET MORPHOLOGIE DU STAPHYLOCOQUE. — L'expérience qui vient d'être décrite peut fournir des indications plus précises. Le fait que les six taches de diffraction sont disposées de telle façon que l'hexagone dont elles occupent les sommets ait un axe vertical (fig. 12 et 13) signifie que les bactéries sont disposées toutes de manière que leur contour hexagonal ait au contraire *deux de ses côtés horizontaux* (fig. 16, II).

Si ce contour hexagonal avait un axe disposé verticalement, les taches seraient disposées comme l'indique la figure 16, I.

Ce mode d'orientation de la bactérie s'explique d'ailleurs par le fait que dans la position 16, II, elle dispose son plus grand diamètre dans la direction du mouvement de glissement.

Mais que va-t-il arriver si nous utilisons non plus une culture formée de cocci isolés mais une culture de cocci groupés tous par paires ? Il est pratiquement impossible d'obtenir une telle culture. On peut tout au plus atteindre un pourcentage d'environ 75 p. 100 de cocci associés en paires, les autres étant isolés. L'expérience de diffraction après orientation échoue alors presque complètement. On obtient un système de taches diffuses, qui semble résulter de la superposition des schémas 16, I et II. Cela provient très certainement d'une orientation du grand axe des paires dans le sens du glissement (16, III), tandis que les cocci isolés s'orientent comme précédemment (16, II). Il y a mélange des deux diagrammes, et on aperçoit un anneau sensiblement continu, ne se résolvant pas clairement en taches.

Comme l'orientation des paires ne peut être que celle de la figure 16, III, la conclusion d'une orientation des cocci isolés suivant le schéma 16, II se trouve confirmée.

Revenons à la diffraction par culture de cocci isolés. Nous avons dit qu'un léger déplacement des plans de verre de haut en bas amenait une rotation d'ensemble du système de taches, puis leur remplacement par un anneau. On peut imaginer, ou bien que la direction du mouvement ayant tourné de 90° , on passe de la position 16, II à 16, I, ce qui fait tourner aussi le système de tache. Mais comment passe-t-on à un anneau ? Il faut pour cela que le contour apparent devienne circulaire, ce qui n'est possible que dans la position 17, IV. Dans la position légèrement différente 17, V, on observerait un anneau incomplet et deux taches un peu plus écartées au centre.

Il est difficile de distinguer entre les deux dernières possibilités. L'anneau qu'on observe paraît bien continu, de sorte que le schéma 17, IV me semble devoir être seul retenu. Il correspond à une position très particulière de la bactérie, ce qui explique qu'on ne puisse obtenir la formation de l'anneau de diffraction que pour une seule position relative des plans de verre au cours du mouvement de bas en haut. Si le mouvement continue, on

revient aux six taches. La bactérie a pivoté et repris la position de la figure 16, I.

Il est remarquable que les mouvements des cocci s'opèrent avec un tel ensemble : identité des positions, simultanéité des rotations. C'est évidemment l'un des effets d'une absolue régularité de leur morphologie, régularité mise en évidence par la netteté de l'effet

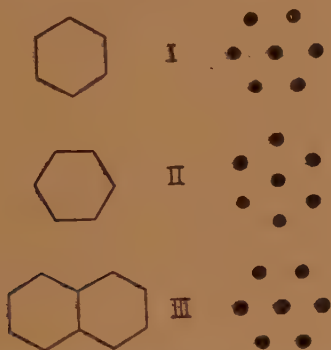


FIG. 16. — Schéma des figures de diffraction correspondant à une suspension de particules ayant la forme indiquée figures 14 et 15, après orientation dans différentes positions (l'axe de symétrie hexagonal restant toujours *normal* aux plans de verre).

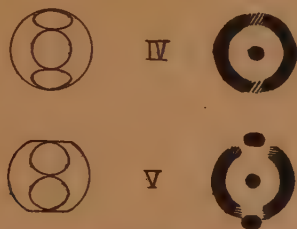


FIG. 17. — Figures de diffraction prévues après orientation dans différentes positions (l'axe de symétrie hexagonal restant cette fois *parallèle* aux plans de verre).

de diffraction. Il ne peut être question de considérer le modèle de la figure 15 comme un schéma moyen, dont chaque coccus s'écarterait plus ou moins.

Pour que les phénomènes optiques observés aient cette netteté et cette pureté, il faut de toute nécessité que les bactéries aient une forme géométrique aussi bien définie que celle d'un cristal. Ce qu'on ignore seulement, c'est si les facettes découpées dans la sphère ont un diamètre assez grand pour être tangentes les unes aux autres (comme c'est le cas dans les figures 14 et 15), ou

si elles sont séparées par un isthme de surface sphérique. Mais c'est là un détail que la diffraction peut difficilement indiquer : il faudrait pouvoir mettre en évidence une très petite différence de distance des taches de diffraction périphériques à la tache centrale. L'expérience ne le permet pas.

Une objection grave peut être faite à ce qui vient d'être exposé. C'est que les cocci pourraient être sphériques, mais *déformables*. Entre les plans de verre, pressés les uns contre les autres, ils subiraient des déformations mutuelles qui précisément devraient les transformer en polyèdres à contour hexagonal. L'effet observé ne serait que l'indice de ces déformations mutuelles.

Il est facile d'écarter complètement cette objection par deux arguments. Le premier est que, dans le cas d'une déformation d'ensemble, on pourrait observer six taches de diffraction, mais sans qu'il y ait de raison pour que la figure de diffraction s'oriente selon 16, II, plutôt que selon 16, I. D'autre part, quand le glissement cesserait, pour changer de sens, la compression continuerait de s'exercer de la même manière, sans interruption. Il n'y aurait pas de raison pour qu'on observât une éclipse brusque du système de taches au moment du changement de sens. Enfin la *rotation du système des six taches*, quand la direction du mouvement change de 90°, serait totalement incompréhensible.

Le deuxième argument est le suivant : si on réalise le glissement avec un feuillet très épais (distance des plans de verre 25 μ , environ) on observe déjà nettement, par glissement, la figure de diffraction 12. Si on diminue l'épaisseur progressivement, jusqu'aux environs de 5 μ , le phénomène augmente de netteté mais ni l'aspect, ni la position des taches ne sont modifiés. On a seulement rendu plus parfaite l'orientation sans la changer. Or dans le premier cas l'écartement des plans est environ vingt-cinq fois plus grand que le diamètre bactérien. La compression est si minime qu'on a du mal à opérer le glissement sans que la bouillie microbienne ne coule entre les plans. Il ne peut être question alors d'une déformation, même légère.

Une autre objection, qui pourrait être faite à notre interprétation, est que nous avons posé *a priori* que la diffraction ne pouvait être produite que par réflexion de la lumière en divers points de la *surface* de la bactérie. On pourrait tout aussi bien se demander si le corps bactérien n'est pas pourvu d'une structure *interne* qui serait responsable de la diffraction, alors que la surface, de forme quelconque, ne jouerait aucun rôle essentiel. Ainsi le staphylocoque pourrait être sphéroïdal et posséder une structure interne à symétrie hexagonale. Si cette hypothèse a été écartée *a priori*, c'est pour les raisons suivantes :

1° L'examen des bactéries à l'ultra-microscope, sur fond bien noir, montre clairement que les individus jeunes, sur lesquels précisément nous expérimentons, ont un corps bactérien parfait-

tement transparent et homogène (donc d'indice de réfraction uniforme), dans le cas des bactéries du groupe typhique, comme dans le cas du staphylocoque. Il est donc impossible d'admettre qu'à l'intérieur de la bactérie existe une structure différenciée symétrique au point de vue des propriétés optiques.

2° A moins qu'il ne s'agisse d'une sorte d'enclave polyédrique unique, occupant la majeure partie du corps bactérien, il serait impossible qu'elle fût responsable du phénomène observé : en effet, le calcul des dimensions de l'élément diffractant par les méthodes approximatives indiquées dans la première partie conduit à des dimensions qui sont à peu de chose près celles de la bactérie elle-même, une incertitude subsistant seulement sur l'identité des deux valeurs à cause de la méconnaissance de l'indice de réfraction du protoplasma bactérien.

3° Si la symétrie du diagramme de diffraction ne correspondait pas à la symétrie de la *surface* de la bactérie, on ne comprendrait pas qu'il y eût *orientation* de toutes les bactéries simultanément. Il faudrait imaginer qu'à la dissymétrie de structure interne correspondrait une dissymétrie de forme extérieure, ce qui reviendrait à confondre les deux explications.

Le plus simple est donc de conclure qu'*au point de vue optique, en lumière visible*, l'intérieur de la bactérie est formé d'un milieu réfringent, transparent et homogène, et que seule la forme extérieure est responsable des phénomènes de diffraction observés. Cela évidemment ne signifie pas nécessairement que le protoplasma bactérien est dépourvu de tout arrangement moléculaire interne régulier et peut-être symétrique. C'est là un problème que nous n'avons pas encore pu aborder, et qui se rattache à l'autre problème, celui-là d'ordre biologique, que nous allons évoquer dans le paragraphe suivant.

VIII. RELATION ENTRE LA FORME INDIVIDUELLE DU STAPHYLOCOQUE ISOLÉ ET SON MODE D'ASSOCIATION EN GRAPPES. — Si on observe à fort grossissement une préparation de staphylocoques étalée sur lame, fixée et colorée par les procédés habituels, on sait que, dans le cas d'une culture de plusieurs jours, les cocci apparaissent groupés en « grappes ». La disposition relative des cocci (fig. 18) est alors une disposition en quinconce. C'est-à-dire que, par rapport à l'un quelconque d'entre eux, les voisins immédiats ont leur centre situé le long des axes d'un hexagone régulier dont il est lui-même le centre (fig. schématique 19). Le phénomène est net, aussi bien pour les groupes de 3 ou 4 cocci que pour les amas plus importants. De plus, il semble bien qu'il y ait association *en tapis* dans un seul plan. L'examen ultra-microscopique d'une suspension de microbes vivants confirme cette manière de voir. Mais les tapis de cocci en quinconce ont tendance à se replier sur eux-mêmes, dès que leur surface devient grande, de sorte

qu'il est difficile de vérifier, sur le vivant, l'absence complète de cocci associés en couches plurimicrobiennes.

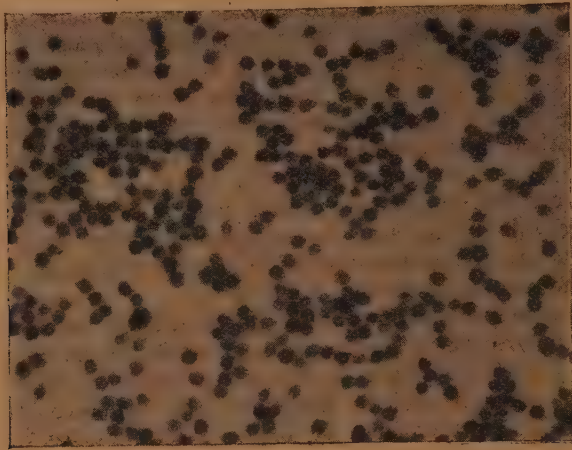


FIG. 18. — *S. aureus*. Etalement sur lame d'une culture de quarante-huit heures sur gélose inclinée, repiquée d'une culture très ancienne de *S. aureus*. Coloration à la fuchsine phéniquée. Gross. : 2.000.



FIG. 19. — Disposition schématique relative des cocci, dans les « grappes » de la préparation microphotographiée figure 18. La symétrie hexagonale des grappes correspond à la symétrie individuelle des cocci, telle que l'expérience de diffraction la révèle, et telle que la montre le modèle proposé figure 15. Dans ce dessin schématique, les cocci ont été seulement représentés, pour plus de simplicité, par des taches noires à contour circulaire.

Ces cocci associés dans un plan, suivant une symétrie hexagonale, s'ils sont sphériques, mais subissent des déformations réciproques, doivent logiquement prendre précisément la forme

que l'expérience de diffraction a révélée chez les cocci isolés. La question se pose donc de savoir si, chez ces derniers, cette forme n'est pas le résultat d'une association initiale en grappes suivie d'une mise en liberté. L'hypothèse ne peut être retenue. En effet, les conditions dans lesquelles se fait la culture des cocci isolés sont telles qu'à tout moment, sauf durant leur naissance par scissiparité, ils ont été isolés. C'est même là une condition de réussite de l'expérience de diffraction. On est donc conduit à renverser la proposition et à dire que l'association en grappe, suivant une symétrie hexagonale, est un *résultat* de la morphologie individuelle du coccus. Aucun autre mode d'association ne pourrait s'accorder aussi bien avec sa forme géométrique externe. Il est remarquable enfin que, lorsque les conditions de culture sont telles que les cocci sont tous *identiques* (en forme et en dimensions), ils restent *isolés* et forment un tapis continu à la surface du milieu, sans colonies discrètes. L'*association* des cocci en *grappes* et de ces grappes en *colonies* serait peut-être liée à la *disparité* des cocci dans les conditions de culture quelconques. Ce qui expliquerait le fait que, dans la pratique, il est rare d'obtenir par étalement sur lame une préparation où la disposition hexagonale relative des cocci dans les grappes soit *rigoureusement* régulière.

IX. SYMÉTRIE DU STAPHYLOCOQUE ET DIRECTIONS DE DIVISION. — Si les facettes du coccus ne peuvent être attribuées à une association antérieure en « grappes », est-il du moins possible de les regarder comme des *cicatrices* laissées par des bipartitions de scissiparité ?

Un calcul de probabilités très simple montre que, quelle que soit la manière dont un individu initial se subdivise pour donner naissance, par scissiparités successives, à un grand nombre de descendants, chacun de ces descendants ne peut porter *en moyenne* que *deux* cicatrices. L'expérience de diffraction, si les seules facettes existantes étaient d'origine cicatricielle, ne pourrait donc réussir. D'autre part, on ne comprendrait pas l'origine de la symétrie hexagonale de la bactérie.

On est donc obligé d'admettre que l'existence des facettes est indépendante du fait que le coccus porte un nombre plus ou moins grand de cicatrices. Ces facettes sont un élément morphologique propre de l'espèce.

Mais cela veut-il dire qu'elles n'interviennent pas dans la division de la bactérie ? Bien au contraire, il est raisonnable d'imaginer que quand un coccus se divise en restant associé à ses cellules-filles pour donner naissance à une grappe plane, les directions de division sont celles des axes de l'hexagone, c'est-à-dire les axes perpendiculaires aux six facettes, puisque ces directions sont celles des alignements de files de cocci dans la grappe. En

d'autres termes, pour chaque coccus, il y aurait six directions équivalentes dans lesquelles la division pourrait s'effectuer. Il y aurait donc une correspondance entre la *symétrie* morphologique externe de la bactérie et la *symétrie* de son mode de division. Il est permis de se demander si cette correspondance n'est pas l'indice d'une analogue *symétrie de structure interne* de la bactérie. C'est la question que déjà nous nous étions posée au paragraphe VII.

X. CONFRONTATION DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC CEUX DE LA MICROPHOTOGRAPHIE ÉLECTRONIQUE. — La diffraction de la lumière, dans l'examen microscopique ou ultra-microscopique ordinaire, ne permet pas, nous l'avons vu, de contrôler directement par de simples agrandissements photographiques, d'images microscopiques de staphylocoques isolés, si les conclusions précédentes sont conformes à la réalité. Tout au plus doit-on noter que, quand on examine une suspension de staphylocoques en cocci isolés vivants, à l'ultra-microscope, on perçoit un léger scintillement qui n'aurait pas lieu si chaque élément était assimilable à une petite sphère transparente parfaitement régulière. Le scintillement suggère la présence de facettes, mais rien ne permet de connaître leur disposition.

Le microscope électronique permet d'éliminer les déformations d'images *par diffraction*, en raison de la petite valeur de la longueur d'onde associée à la particule électronique, par rapport aux dimensions de l'objet examiné. Malheureusement, comme nous l'avons rappelé déjà dans la première partie, l'observation a lieu *dans le vide* et exige une dessiccation préalable de la préparation. Ce ne sont plus les microbes vivants que l'on observe, mais leur cadavre desséché et vraisemblablement déformé, aplati par la déshydratation. Quoi qu'il en soit, les photographies publiées par les auteurs qui ont étudié le staphylocoque sont intéressantes à examiner. Von Ardenne en reproduit deux dans son traité [2]. La figure 363 (Siemens) montre trois cocci unis. Les contours sont peu distincts mais paraissent grossièrement circulaires, sauf dans la région où les cocci sont accolés, laquelle semble légèrement déprimée par déformation. Mais il faut remarquer que, pour que les facettes que nous avons décrites soient visibles, il est nécessaire que le plan dans lequel les cocci s'associent soit parallèle au plan de la figure. Si on réunit par des droites les centres géométriques des trois cocci, on devra trouver alors qu'elles font entre elles un angle de 60° , 120° ou 180° , suivant une des trois positions possibles compatibles avec l'arrangement hexagonal (fig. 19). Si l'angle est compris entre 120° et 180° c'est la preuve que le groupe de cocci s'est posé sur le support *de biais*. C'est précisément le cas de la photographie qui nous occupe, où cet angle a une valeur voisine de 155° . Les cocci

sont alors photographiés dans une position intermédiaire entre celles qui sont schématisées en A et B, figure 14, mais plus près de B que de A. Le contour apparent doit alors être circulaire.

La photographie, figure 364 (A.E.G.), reproduite par von Ardenne, nous montre un groupe de deux cocci à contour cette fois très net et *ovoïde* sans discussion possible. Mais ici rien ne nous permet de savoir dans quelle position, par rapport aux facettes, se trouvent les cocci. Le plus probable est qu'ils reposent par une des facettes sur le plan du support. On est alors dans la position B. On doit donc, si les cocci ont la forme sphéroïdo-polyédrique, noter un aplatissement à chacune des deux extrémités du groupe diplococcique. Or rien de pareil n'est visible ici.

La confrontation, bien que n'étant pas faite dans des conditions d'orientation des cocci favorables, est donc plutôt négative. Il me semble qu'on doit en conclure que la méthode d'observation dans le vide des bactéries desséchées ne donne que des indications très grossières sur la morphologie géométrique à l'état vivant.

XI. CONCLUSIONS. — 1° Quand on observe le phénomène d'irisation intense d'une culture sur gélose, on peut affirmer que, en majorité, les bactéries qui composent la culture ont au moins *une* de leurs dimensions commune.

2° Si on réalise l'orientation par glissement entre deux plans de verre, la diffraction ne subsiste que normalement à la direction de glissement, quand les bactéries ont seulement la *même largeur*.

3° Si elles ont plusieurs dimensions communes, on obtient une *figure de diffraction* comprenant en dehors de la tache centrale plus de deux taches, et la disposition symétrique de ces taches dépend de la symétrie morphologique externe de la bactérie (symétrie binaire avec *B. typhosum*, hexagonale avec le staphylocoque).

4° Le staphylocoque, sous forme de cocci isolés, se comporte comme ayant une forme sphéroïdo-polyédrique à symétrie hexagonale (sphère dans laquelle on a découpé six calottes sphériques, axées sur les diagonales d'un hexagone régulier plan inscrit dans un des grands cercles).

5° Cette forme du staphylocoque isolé correspond à une prédisposition à l'association en grappes, dans un plan et suivant une symétrie hexagonale. Or c'est bien là le mode d'association qu'on observe constamment.

6° Les observations directes, microscopiques, ultra-microscopiques et les microphotographies électroniques après dessiccation ne permettent toutefois pas de contrôler dans des conditions satisfaisantes les conclusions précédentes.

Applications pratiques.

En vue d'applications pratiques, il est peut-être utile d'indiquer de quelle manière on peut réaliser, simplement et rapidement, l'examen d'une culture dans le but de savoir si elle doit être regardée comme composée en majorité de bactéries plates.

Observation des ondes moirées et examen ultra-microscopique.

1° Préparer une suspension de mica, en broyant au mortier un petit fragment, pesant environ 10 cg., dans I ou II gouttes d'eau. Il est nécessaire de broyer énergiquement et de prolonger l'opération pendant cinq minutes environ, de manière à obtenir un peu de bouillie grisaître. On ajoute 50 c. c. d'eau, on laisse décanter quelques secondes, les gros fragments tombent au fond, et on verse le liquide surnageant dans un tube à essai. La suspension présente des ondes très nettes, qu'on observe en plaçant le tube entre l'œil de l'observateur et une source de lumière, fenêtre ou lampe munie d'un abat-jour. Les ondes doivent persister un peu après que l'agitation a cessé. Cette suspension se conserve indéfiniment.

2° Pour observer une bactérie, récolter à l'anse de platine 1 millimètre cube environ de culture, introduire dans un tube à essai contenant 20 c. c. de solution isotonique de chlorure de sodium et mettre en suspension la culture le long de la paroi, un peu au-dessus de la surface du liquide, en tenant le tube incliné et en délayant doucement dans quelques gouttes de liquide. Quand la suspension est homogène, examiner comme précédemment, en comparant l'intensité du phénomène dans les deux suspensions, de mica, et de bactéries examinées. On dira que les ondes moirées sont intenses, si leur netteté est aussi grande, ou plus grande, avec les bactéries.

3° Faire un étalement sur lame de la même suspension bactérienne et un examen après coloration, à immersion 1/15. Si les bactéries sont au plus deux fois plus longues que larges et si les ondes sont intenses, la bactérie doit être considérée comme plate. Si sa longueur est plus grande, il y a doute.

4° Faire un examen de la suspension microbienne, à l'ultra-microscope, à l'objectif 4. Si on observe un scintillement net, le caractère plat de la bactérie est confirmé. On peut, pour se familiariser avec le scintillement, comparer avec la suspension de mica. Mais l'indice de réfraction élevé de ce minéral fait que le phénomène est alors très intense. On ne doit s'attendre, dans le cas des bactéries, qu'à observer quelque chose d'analogue avec un éclat atténué.

5° Si la suspension bactérienne ne donne pas d'ondes moirées ou donne des ondes à peine visibles, examiner à l'ultra-microscope, à immersion 1/10, la suspension. Si les bactéries sont bien isolées les unes des autres et n'ont pas tendance à s'accoler, on peut affirmer que la bactérie est cylindrique. Si au contraire la tendance à l'accolement est manifeste, il se peut que la bactérie soit plate et que l'absence d'ondes moirées provienne de la gêne apportée par l'accolement des bactéries à leur libre orientation dans le liquide en remous.

Il faudrait alors s'efforcer de trouver des conditions de culture qui rendent à la bactérie sa liberté, pour refaire l'essai dans des conditions plus favorables.

6° On pourra enfin faire la comparaison avec *B. typhosum* cultivé comme il a été dit plus haut.

Voyons maintenant quelles applications on peut envisager.

Classification systématique des bactéries.

Il serait intéressant de savoir si les observations sommaires faites sur *B. coli* sont ou non généralisables. Il se peut en effet que, comme il semble que c'est le cas pour ce germe, le caractère plat ne soit pas valable à tous les stades de développement des bactéries. Même alors, il faudrait savoir si certaines espèces présentent *toujours*, dans des conditions de culture convenable, le caractère plat. Ce caractère pourrait peut-être alors être pris en considération dans la classification systématique.

Numération des bactéries par pesée.

Quand on évalue approximativement le nombre des bactéries dans un volume connu d'une suspension, en centrifugeant et pesant le culot de centrifugation d'une part, et évaluant d'autre part le volume d'une bactérie d'après sa longueur et sa largeur, et attribuant une densité arbitraire à la bactérie, on suppose que la bactérie est cylindrique. Si elle est en réalité plate, la méthode cesse évidemment d'être légitime puisque le volume vrai est très inférieur au volume calculé. La méthode ne serait valable que si on avait étalonné pour le germe étudié, et dans les conditions où on le cultive, par pesée et numération directe. Mais il est évidemment très difficile de faire cette numération *directe* avec précision.

Radiobiologie et expériences statistiques.

Dans les expériences où on bombarde la bactérie par une particule ou un photon, on calcule parfois le volume moyen de la bactérie. Ici également le fait que la bactérie est plate peut fausser le calcul.

D'autre part, dans toutes les expériences où on fera une interprétation statistique du résultat d'une action agressive exercée sur la bactérie (irradiation, stérilisation par la chaleur, action d'un antiseptique dissous) on aura avantage à opérer sur une population microbienne homogène. Cette homogénéité peut être d'abord biologique et c'est l'affaire du microbiologiste (race pure, variétés *rough* ou *smooth*, souche modifiée par certaines

actions, etc.). Mais il y a intérêt également à opérer sur une suspension homogène au point de vue de la morphologie purement géométrique, *même forme, mêmes dimensions* et par conséquent *même volume de toutes les bactéries*.

Il y a également intérêt à bénéficier d'une homogénéité optique, toutes les bactéries étant parfaitement *transparentes*, leur corps bactérien étant limpide. Il y a enfin intérêt à ce que toutes les bactéries soient parfaitement *isolées les unes des autres* [10]. Les expériences décrites dans ce travail fournissent une série de critères expérimentaux simples pour apprécier ces divers types d'homogénéité d'une suspension. Dans le cas le plus favorable, on observe à la fois [11] :

1° La suspension donne des ondes moirées (critérium d'indépendance des bactéries, confirmable par l'examen ultra-microscopique).

2° Les bactéries sont optiquement homogènes et transparentes (ultra-microscope).

3° Les bactéries présentent le phénomène d'irisation de la culture et le phénomène de diffraction entre plans de verre après orientation. Si on obtient alors un système de quatre taches, on peut affirmer que les bactéries ont toutes sensiblement la même longueur et aussi la même largeur.

4° Il ne subsiste d'incertitude que sur leur épaisseur, s'il s'agit de bactéries plates. Dans ce cas, on ne devra pas évaluer par le calcul le volume bactérien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANGERER (K. VON). *Arch. für Hygien.*, 1923, **93**, 14.
- [2] ARDENNE (M. VON). *Elektronen-übermikroskopie*, Springer, Berlin, 1940.
- [3] BARNARD. *Morphology in the living state in : A System of Bacteriology in relation to Medicine*. Publ. du Medical Research Council., Londres, 1930, **1**.
- [4] BERTRAND (L.) et ROUBAULT (M.). *L'emploi du microscope polarisant*, J. Lamarre, Paris, 1936, **32**.
- [5] DIESSELHORST (H.) et FREUNDLICH (H.). *Physikalische Zeitschr.*, 1916, **17**, 117.
- [6] GUILLERMOND (A.). *C. R. Ac. Sci.*, 1932, **194**, 2322.
- [7] GUILLOT (M.). *C. R. Ac. Sci.*, 1941, **212**, 1007.
- [8] GUILLOT (M.). *C. R. Ac. Sci.*, 1941, **212**, 1100.
- [9] GUILLOT (M.). *Bull. Soc. Philomathique de Paris*, 1940-1941, **123**, 63.
- [10] GUILLOT (M.). *Bull. Sci. pharmacol.*, 1941, **48**, 243.
- [11] GUILLOT (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 721.
- [12] PIJPER (A.). *J. Path. a. Bact.*, 1936, **34**, (6), 771.
- [13] PRÉVOT (A.-R.). *Etudes de systématique bactérienne. Lois générales. Cocci anaérobies*. Thèse Doct. Univ. Sciences, Masson, Paris, 1933, **56**.

- [14] RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **435**, 275.
- [15] SIEMENS et HALSKE. *Über mikroskop als Forschungsmittel*, W. de Gruyter, Berlin, 1941.
- [16] TOPLEY (W. W. C.) et WILSON (J.). *The principles of Bacteriology and Immunity*, 2^e ed., Londres, 1938. Voir en particulier : Chap. II. The biological characterisation of Bacteria ; Morphology, § 2 : The shape of bacteria cells (p. 17).

ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES SULFAMIDODIAZINES (*)

par F. NITTI, C. COSAR et F. BOYER.

Parmi les très nombreux corps obtenus par le remplacement d'un hydrogène de la fonction sulfamide, les dérivés hétérocycliques se sont montrés des plus intéressants.

La sulfamidopyridine préconisée par Withby possède de remarquables propriétés thérapeutiques dans les pneumococcies expérimentales de la souris et par ailleurs une très grande polyvalence antimicrobienne. Mais ce corps est parfois mal toléré, surtout à des doses élevées en clinique humaine.

Plus récemment, Roblin et ses collaborateurs (1) ont introduit en thérapeutique les sulfamidodiazines et leurs dérivés mono et diméthylés, répondant aux formules suivantes (fig. 1).

Un très grand nombre d'observations expérimentales et cliniques ont été déjà effectuées sur des sulfamidodiazines.

Nous avons étudié la toxicité comparée, l'élimination et la valeur antibactérienne expérimentale de ces trois corps, et ce sont nos résultats que nous allons rapidement résumer.

TOXICITÉ. — La souris blanche de 20 g. supporte sans trouble apparent une dose unique de 200 mg. par la voie buccale de sulfadiazine et de sulfaméthyldiazine. La sulfadiméthyldiazine est légèrement plus toxique et on observe déjà des troubles après administration « per os » d'une dose de 100 mg.

ÉLIMINATION. — Les courbes d'élimination ont été pratiquées par microdosage sur la souris blanche par la technique de Nitti et Joyeux (2).

(*) Note présentée à la séance du 3 février 1944 de l'Association des Microbiologistes de langue française.

(1) ROBLIN, WILLIAM, WINNEK et ENGLISH, *J. Am. Chem. Soc.*, août 1940, 62.

(2) NITTI et JOYEUX, ces *Annales*, 1943, 69, 39.

La sulfadiazine, la sulfaméthyl-diazine et la sulfadiméthyl-diazine s'éliminent très lentement. Le maximum de concentration dans le sang est obtenu six heures après l'ingestion et ces sulfamides sont encore présents dans le sang vingt-quatre heures après l'administration buccale et ils ne sont éliminés complètement qu'après deux à trois jours. Des constatations du même ordre sont fournies par l'étude de l'élimination chez l'homme.

La courbe d'élimination des sulfadiazines se rapproche singu-

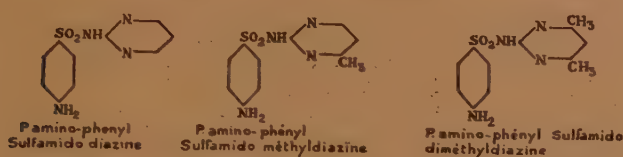


FIG. 1.

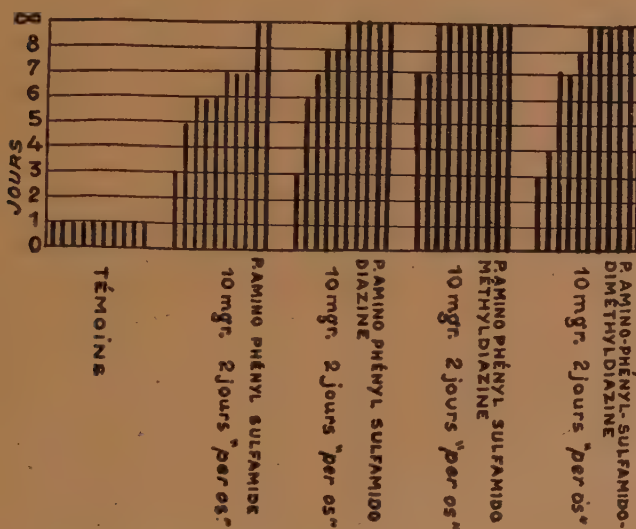


FIG. 2. — Streptocoque hémolytique Dig 7. 10.000 doses mortelles injectées par la voie intrapéritonéale. Traitement *per os* un quart d'heure avant l'inoculation et le lendemain. Chaque colonne représente la durée de la survie d'une souris.

lièrement de celle de la sulfamidopyridine. Il est à noter que ce mode d'élimination semble correspondre à des sulfamides ayant une très grande polyvalence antimicrobienne se manifestant notamment dans les pneumococcies expérimentales de la souris. S'il est difficile de généraliser cette notion, il nous semble utile de signaler les faits.

Les sulfamidodiazines s'éliminent en grande partie par les urines sous forme aminée. Dans le sang, la présence de dérivés conjugués est généralement faible. Elle est plus considérable dans les urines.

Il est à noter que contrairement à ce que l'on observe pour la plupart des autres sulfamides, les dérivés acétylés de la sulfa-

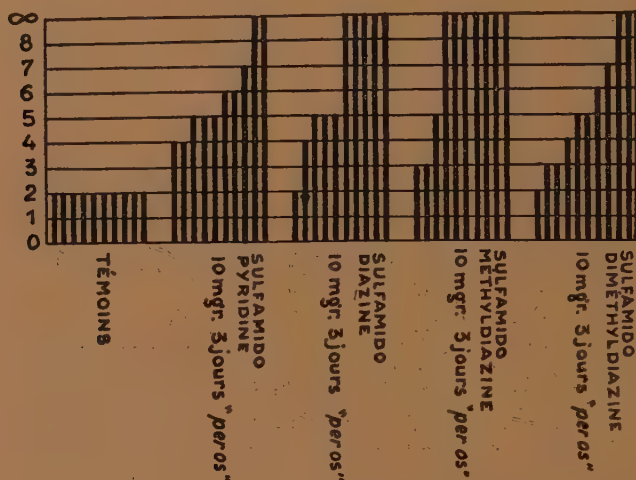


FIG. 3. — Pneumocoque Til (groupe 1). 10.000 doses mortelles injectées par voie intrapéritonéale. Traitement *per os* un quart d'heure avant l'inoculation et les deux jours suivants. Chaque colonne représente la durée de la survie d'une souris.

diazine et de la sulfaméthylidiazine sont plus solubles que les amines correspondantes. Le dérivé acétylé de la sulfadiméthylidiazine est par contre moins soluble.

ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE « IN VITRO ». — Les sulfadiazines comme la plupart des sulfamides ont un pouvoir bactériostatique *in vitro* sur un très grand nombre d'espèces microbiennes.

Les essais pratiqués en milieu synthétique (3) sur *E. coli* *Proteus vulgaris* et *P. Friedlander* montrent que la sulfadiazine et la sulfaméthylidiazine exercent un pouvoir bactériostatique très net à des concentrations de 1 p. 500.000. La sulfadiméthylidiazine est légèrement inférieure. L'acide *p*-aminobenzoïque inhibe l'activité bactériostatique des sulfadiazines. Il est à noter qu'une molé-

(3) LWOFF, NITTI et TH. TRÉFOUËL, ces *Annales*.

cule d'acide inhibe l'activité de 10 molécules de sulfadiazine ou de ses deux dérivés mono ou diméthylé. Dans les mêmes conditions une molécule d'acide *p*-aminobenzoïque inhibe 100 molécules de sulfamidopyridine et 500 de *p*-aminophénysulfamide. D'autre part, les sulfadiazines sont également très peu sensibles à l'action antagoniste des peptones.

ACTIVITÉ EXPÉRIMENTALE ANTIBACTÉRIENNE « IN VIVO ». — Les activités comparées antimicrobiennes dans les infections expéri-

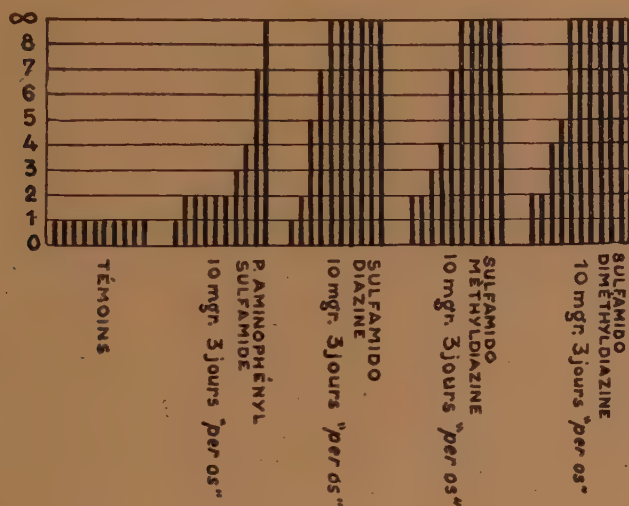


FIG. 4. — Staphylocoque doré 133. 10.000 doses mortelles injectées par la voie intrapéritonéale (dans 1 c.c. de mucine). Traitement *per os* un quart d'heure avant l'inoculation et les deux jours suivants. Chaque colonne représente la durée de survie d'une souris en jours.

mentales provoquées par le streptocoque hémolytique, le pneumocoque et le staphylocoque sont résumées dans les figures suivantes (fig. 2, 3 et 4) :

La sulfadiazine et la sulfaméthylthiazine sont également actives dans les infections provoquées par le pneumobacille de Friedlander et dans la gangrène gazeuse provoquée par le *Clostridium Welchii*.

En résumé les sulfadiazines ont une remarquable activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo*. Parmi les trois dérivés, la sulfaméthylthiazine semble être la plus active, notamment dans les infections pneumococciques et streptococciques.

La très faible toxicité des sulfamidodiazines et leur très grande

tolérance chez l'homme, même à des doses considérables, rendent l'emploi clinique de ces corps extrêmement intéressant, particulièrement dans les cas où il est nécessaire d'atteindre des concentrations de médicament très élevées dans l'organisme, et notamment dans les méningites à pneumocoques, et dans les septicémies.

RECHERCHES SUR LES NUCLÉOPROTÉIDES DES MICRO-ORGANISMES

I. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PROBLÈME ANALYTIQUE (*)

par R. SARCIRON, R. VENDRELY et M^{lle} O. BRIAND.

(Institut Pasteur, annexe de Garches.)

L'importance des nucléoprotéides dans la constitution des cellules vivantes en général n'est plus à démontrer. Les micro-organismes : levures, bactéries, et plus encore virus, en sont particulièrement riches.

Résultant de la combinaison entre une protéine et un groupement prosthétique représenté par un acide nucléique, les nucléoprotéides nous intéressent par leur teneur en ce dernier élément. Déterminer leur richesse en acide nucléique par dosage du phosphore semblerait au premier abord la méthode la plus aisée. Mais les nucléoprotéides n'étant pas les seuls constituants cellulaires renfermant du phosphore (phosphoprotéides, phospholipides, esters phosphorés, etc.), l'emploi d'une telle technique manquerait de spécificité. Il est par conséquent préférable de s'adresser à un groupement constitutif plus particulier de l'acide nucléique. Les bases puriques sont tout indiquées étant donné qu'on possède pour doser ces dernières des méthodes sensibles et spécifiques.

Nous rappelons brièvement les deux méthodes de dosage de ces bases : celle de Salkowski (1) par précipitation argentique, donnant des résultats par défaut dus à la solubilité des complexes formés, abandonnée le plus souvent pour celle de Kruger et Schmid (2) qui comporte une précipitation cuivreuse. Lorsque l'on considère les publications antérieures sur le dosage des bases puriques dans les acides nucléiques et les nucléoprotéides, on note des divergences assez notables quant aux résultats obtenus par les différents auteurs. Ayant besoin pour certaines recherches d'une méthode d'analyse très précise, nous avons été amenés à reprendre la question et nous pensons que la publication de nos

(*) Note présentée à la séance du 6 janvier 1944 de l'Association des Microbiologistes de langue française.

(1) SALKOWSKI, *Pflügers Archiv.*, 1898, **69**, 280.

(2) KRUGER et SCHMID, *Z. physiol. Chem.*, 1905, **45**, 1.

conclusions pourra rendre service à ceux qu'un semblable problème intéresse.

Lorsque l'on veut doser des bases puriques engagées en combinaison, il est nécessaire de les libérer par hydrolyse acide, chlorhydrique ou sulfurique par exemple. L'imprécision des données fournies par les différents textes sur les conditions de cette hydrolyse et quelques essais préliminaires nous ont amenés à reconsidérer cette opération qui nous a paru essentielle. Tout d'abord, nous avons cherché à connaître le degré de résistance des bases puriques au chauffage en milieu acide. Nous avons constaté que

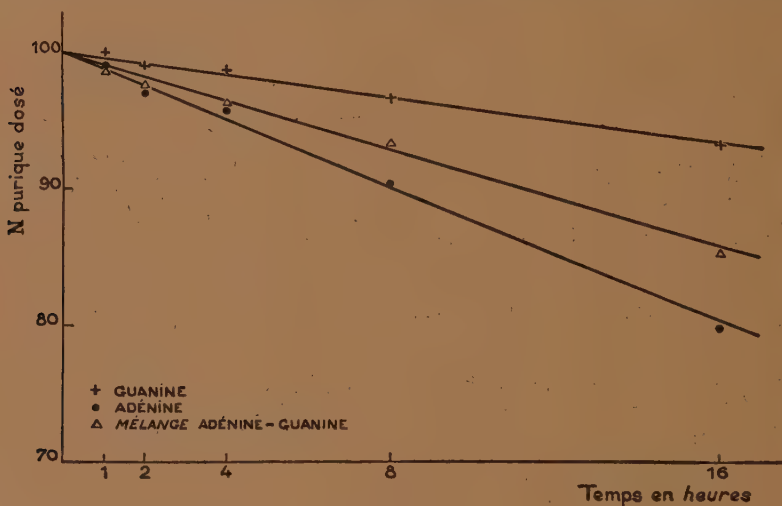


Fig. 1.

l'adénine et la guanine en solution chlorhydrique normale se détruisent par chauffage au bain-marie bouillant de façons inégales, mais suivant des lois sensiblement linéaires (fig. 1).

Il en est de même pour un mélange équimoléculaire d'adénine et de guanine, bases qui, comme on le sait, entrent en parties égales dans la constitution des acides zymo et thymo-nucléiques.

Il nous a été ainsi possible de définir un coefficient de correction.

Nous avons pu en outre vérifier que la destruction dont il s'agit n'est pas une simple désamination avec libération d'ammoniaque, mais un phénomène plus complexe intéressant le noyau purique lui-même. Nous sommes d'accord en cela avec les autres auteurs qui ont constaté le même phénomène, mais en travaillant, il est vrai, dans des conditions bien plus brutales, au-dessus de 100° et le plus souvent en milieu très fortement acide.

Mélange adénine-guanine.

	TEMPS DE CHAUFFAGE en heures					
	0	1	2	4	8	16
N purique dosé p. 100	160	98,8	97,8	96,3	93,3	85,8
Pertes p. 100	0	1,2	2,2	3,7	6,7	14,2

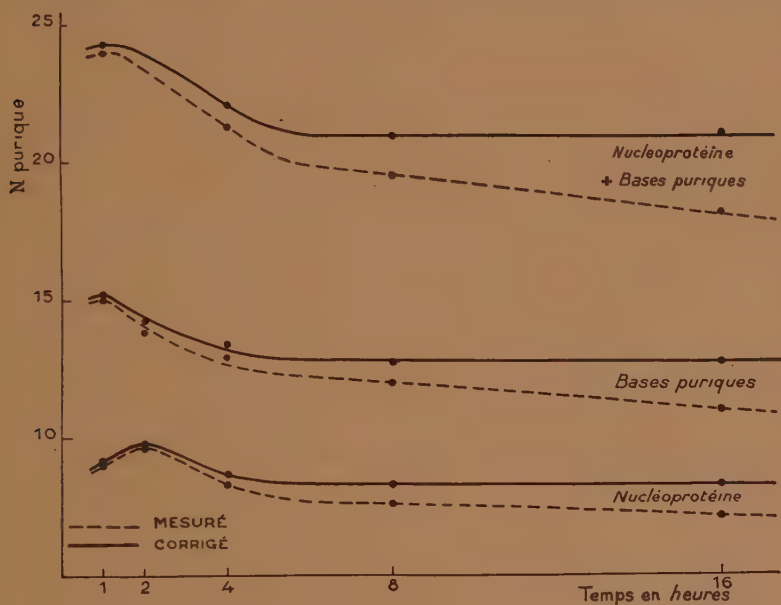


FIG. 2.

Etant donné ce que l'on sait de la constitution des acides nucléiques, il était naturel de s'attendre à voir ces derniers se comporter à l'hydrolyse acide, comme le mélange de guanine et d'adénine. Opérant d'une part avec un échantillon d'acide zymonucléique soigneusement purifié par nous et amené à une constitution pratiquement théorique [N total = 16,12 p. 100, P = 9,28 p. 100, N purique = 10,70 p. 100] (3), d'autre part, avec divers échantillons encore impurs, nous avons pu constater qu'il en était bien ainsi. Les bases puriques sont rapidement libérées et le mélange subit de la part de l'acide une action destructrice identique à celle

(3) LEIPERT et KUROKAWA, *Bioch. Zeits*, 1932, 246, 1.

que l'on constate pour le mélange des deux bases puriques libres.

Ces points une fois acquis, restait le problème essentiel, celui du comportement d'un nucléoprotéide. Au premier abord, un produit de cette nature peut sembler donner des résultats aberrants. Contrairement à ce que l'on pourrait espérer, dès les premières heures de l'hydrolyse, on note au dosage de l'azote purique des résultats beaucoup plus forts que ne le laisserait supposer la teneur en phosphore ; l'application du coefficient précédemment déterminé ne donne pas satisfaction. Sans aucun doute il s'agit de surcharges dues à une hydrolyse insuffisante des constituants

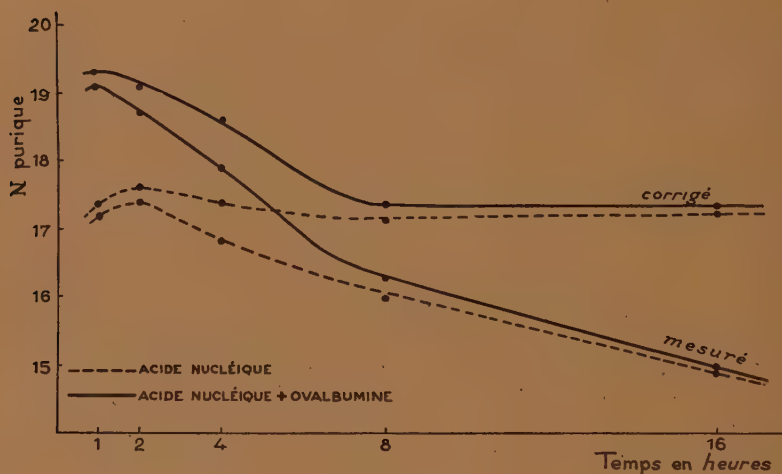


FIG. 3.

protidiques et qui demeurent malgré la pratique constante d'une double précipitation cuivreuse. Il est donc nécessaire de s'assurer qu'il en est bien ainsi et d'établir à quel moment cette surcharge n'intervient plus dans les dosages.

Un premier essai effectué avec un mélange nucléoprotéide + base purique, par comparaison avec le nucléoprotéide seul (fig. 2), nous a permis, en effet, de constater que nos résultats, exprimés en bases puriques et après correction, étaient entachés d'une erreur par excès et qu'une hydrolyse d'au moins huit heures était nécessaire pour avoir des résultats convenables.

Une expérience complémentaire nous a prouvé que cette surcharge est bien due à une hydrolyse insuffisante des protides. En effet, en opérant avec un mélange d'acide nucléique et d'ovalbumine, nous avons obtenu une courbe analogue à celle d'un nucléoprotéide, mettant en évidence, au début, une surcharge,

et après huit heures donnant un résultat correspondant à l'acide nucléique seul (fig. 3).

En résumé, la double précipitation cuivreuse selon Kruger et Schmid donne des résultats très convenables pour le dosage des bases puriques libres ou en combinaison, à condition d'appliquer aux résultats une correction variant linéairement avec le temps d'hydrolyse en milieu acide et, dans le cas des nucléoprotéides, de chauffer la matière étudiée pendant un temps suffisamment long (huit heures par exemple) pour détruire totalement les protéides et éviter ainsi toute surcharge possible.

Nous reviendrons prochainement vous indiquer quels résultats nous avons pu obtenir en appliquant cette méthode à divers problèmes intéressant la microbiologie.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 2 mars 1944.

COMMUNICATIONS (SUITE ET FIN)

RECHERCHES SUR UN NOUVEAU COCCUS ANAÉROBIE *STAPHYLOCOCCUS ACTIVUS* n. sp.

par A.-R. PRÉVOT et J. TAFFANEL.

A la suite d'une grossesse gémellaire mal supportée, terminée par un accouchement prématuré difficile (travail de trois jours, poche des eaux rompue le premier jour, application de forceps) une jeune femme de vingt-trois ans présente une septicémie puerpérale très grave avec métastases rénales, hépatiques et pulmonaires répétées qui, malgré une sulfamidothérapie intense et précoce, aboutit à la mort en quinze jours. Deux hémocultures pratiquées l'une au début, l'autre à la fin de cette septicémie mortelle (1) ont donné chaque fois une culture pure et abondante d'un staphylocoque anaérobie dont nous avons fait l'étude suivante :

Morphologie. — Coccus de $0,8 \mu$ à 1μ de diamètre environ, en petits amas irréguliers, immobile, non cilié, non sporulé, Gram positif.

Physiologie. — Anaérobie strict, poussant bien à 37° , ne résistant pas à 70° ; réducteur (le rouge neutre est réduit temporairement; la safranine partiellement et temporairement). La longévité dépasse deux mois.

Caractères cultureux. — Cultures rapides, abondantes, gazeuses et putrides. En gélose profonde les colonies sont lenticulaires, d'apparition précoce, de taille moyenne, avec dégagement de gaz abondant; en eau peptonée, léger trouble; en bouillon glucosé, trouble abondant, très gazeux, d'odeur très fétide avec légère acidification à pH 6,8. La gélatine est liquifiée en quarante-huit heures; le lait est d'abord coagulé, en quarante-huit heures, puis complètement digéré en quatre à cinq jours, avec dédoublement des lipides et odeur très fétide; le sérum coagulé, le blanc d'œuf, la fibrine et la cervelle subissent un début de digestion avec noircissement marqué et dégagement abondant d' SH_2 .

Les glucides suivants sont énergiquement fermentés, avec dégagement gazeux

(1) Nous remercions vivement les D^{rs} B. Desplas et Antonelli ainsi que les laboratoires Bruneau de nous avoir permis de faire cette étude.

abondant : glucose, lévulose, maltose, galactose et saccharose; le lactose, l'arabinose et le xylose ne sont que légèrement attaqués.

Le nitrate de sodium n'est pas réduit en nitrite.

Caractères biochimiques. — La fermentation du bouillon glucosé à 1 p. 100 est rapide et très active. La quantité de glucose détruit est de 0,24 g. pour 100 c.c. Le pH terminal n'est que 6,8 à cause d'une quantité importante d' NH_3 formé (0,061 g. p. 400). L'acidité volatile atteint 0,117 g. p. 100. Elle consiste en un mélange d'acide butyrique et propionique (B/P = 3/1). Dans le premier distillat on trouve une quantité énorme d'indol, d'amines volatiles, d'aldéhydes et de l'acétylméthylcarbinol, mais ni alcool, ni cétone, ni phénol. L'acidité fixe est aussi très marquée, consistant uniquement en acide lactique.

Pouvoir pathogène. — L'étude du pouvoir pathogène de ce coccus pose à nouveau un problème ardu et irrésolu de la bactériologie : l'injection de quantités massives de cultures ou de microbes par voie musculaire, péritonéale ou veineuse ne cause pas la plus petite lésion au cobaye, à la souris et au lapin. Cependant ce microbe ayant été isolé deux fois par hémoculture dans un cas de septicémie puerpérale mortelle à l'exclusion de tout autre germe à certainement joué un rôle dans l'infection, peut-être même le rôle exclusif. Ce fait est à rapprocher d'ailleurs du comportement de la presque totalité des cocci anaérobies, en particulier de *Streptococcus putridus*, qu'on trouve à l'origine d'un grand nombre d'infections puerpérales en dehors de toute autre étiologie possible, et qui est très peu ou pas du tout pathogène pour l'animal d'expérience. Ou bien les cocci anaérobies ne sont pathogènes que pour l'homme et ceci dans des conditions très particulières (traumatisme, puerpérium, etc.); ou bien ils perdent très rapidement leur pouvoir pathogène : dès la première culture on ne peut déterminer aucune lésion à l'animal; ou bien nous ne connaissons pas l'animal réceptif (qui est peut-être un singe supérieur) ou enfin il manque dans les cultures un facteur de virulence jusqu'ici inconnu. L'un de nous qui étudie cette question depuis vingt ans n'a encore pu observer aucun fait de nature à éclairer ce problème.

Agglutination. — Un lapin préparé par des injections intraveineuses de corps microbiens lavés en suspension physiologique, à doses croissantes de 1 c.c. à 25 c.c. a donné dix jours après la dernière injection un sérum agglutinant agissant très lentement au 1/2.500 (agglutination lente à très petits grains). Ce sérum n'agglutine pas les souches de *Staphylococcus aerogenes*, de *Staphylococcus anaerobius* et de *Staphylococcus asaccharolyticus* de notre collection.

Réciproquement les sérums agglutinants anti-*aerogenes*, anti-*asaccharolyticus* et anti-*anaerobius* de notre collection n'agglutinent pas le staphylocoque isolé par nous. Il n'y a donc aucune parenté sérologique entre ces espèces et notre germe.

Position dans la systématique. — La morphologie de ce coccus nous incite à le classer sans hésitation dans le genre *Staphylococcus*. Les espèces anaérobies connues de ce genre au nombre de trois se groupent en gazogènes et non gazogènes (2). C'est avec les premières qu'il faut comparer cette espèce. Il se distingue d'emblée de *Staphylococcus aerogenes* Schottmuller 1912 en ce que celui-ci est sérophile, non fétide, ne liquéfie pas la gélatine, ne coagule pas et ne digère pas le lait, et est un ferment acéto-butyro-lactique. Il se distingue de *Staphylococcus asaccharolyticus* Distaso 1912 en ce que celui-ci a une plus grande taille (1 μ à 1,2 μ) des colonies punctiformes, des cultures formant un dépôt muqueux; la gélatine n'est pas liquéfiée; le lait non modifié; les glucides non fermentés; c'est un ferment acéto-propionique. Il se distingue également de la variété *indolicus* pour les mêmes raisons.

Il s'agit donc d'une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le

nom de *Staphylococcus activus*, en raison de son métabolisme protéolytique et fermentaire très actif, et même le plus actif que nous ayons rencontré jusqu'ici parmi les cocci anaérobies. Il est possible que cette espèce ait été entrevue par Schöttmüller en 1923 (3) dans des cas d'infection puerpérale et nommée *Staphylococcus putrificus*. Mais il est absolument impossible de le savoir, attendu que l'auteur n'a pas décrit ce Staphylocoque et s'est contenté de dire qu'il se distingue de *Staphylococcus aerogenes* en ce qu'il peut se passer d'albumine fraîche pour croître en gélose. A ce sujet nous faisons remarquer une fois de plus que les descriptions incomplètes d'espèces nouvelles ne permettent pas de les retrouver et ne font qu'encombrer la bactériologie.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Séance du 13 avril 1944.

Présidence de M. NOËL BERNARD.

COMMUNICATIONS

LA DÉSINTÉGRATION DES MICROBES PAR LES ULTRASONS

par P. GRABAR et M. ROUYER.

L'extraction à basse température des constituants microbiens est un problème qui préoccupe particulièrement le microbiologiste et le biochimiste car aucune des méthodes habituelles ne donne pleinement satisfaction. Il était donc intéressant d'étudier sur diverses espèces microbiennes l'effet désintégrateur d'un nouveau et puissant projecteur d'ultrasons à lame de quartz mis au point par une firme française (1).

Les premières observations de l'action biologique des ultrasons furent faites par Langevin qui, au cours des essais de son projecteur pour la marine (1917), remarqua les troubles paralytiques momentanés ou mortels présentés par des poissons. Il constata aussi les sensations de brûlures que subissait la main plongée dans un liquide en forte agitation ultrasonore. Quelques années plus tard, Wood et

(3) SCHÖTTMÜLLER, *Leitfaden Klinisch-bakteriolog. Kulturmethoden*. Berlin und Wien, 1923, p. 51.

(1) Société de Condensation et d'Applications Mécaniques.

Loomis (2) signalaient l'activité des ultrasons sur les infusoires, puis les travaux de Harvey et Loomis (3) sur une bactérie lumineuse (*B. fischeri*), de Williams et Gains (4) sur le *B. coli*, de Beckwith et Olsen (5) sur la levure et de Hopwood (6) sur le virus de la vaccine démontrèrent l'action létale des ultrasons sur les microorganismes. Peu après, Chambers et Flosdorf (7) utilisèrent les ultrasons pour extraire des antigènes du *B. typhi* et du *Streptococcus hemolyticus*; plus récemment, Chambers et Weil (8) ont décrit les propriétés immunologiques des extraits de pneumocoques ultrasonnés. En France, peu d'auteurs utilisèrent les ultrasons; les résultats qu'ils obtinrent ne furent guère encourageants. C'est ainsi que Païc, Deutsch et Borcila (9) ont été incapables de détruire les bactéries avec leur appareil.

Dans nos premiers essais avec un générateur de faible puissance, nous n'avions obtenu que 40 p. 100 de mortalité sur le *B. paradyssenteriae*; par contre, dans nos dernières expériences (10), grâce à la puissance développée par le projecteur, nous sommes arrivés à désintégrer un pourcentage très élevé de microorganismes, même de ceux réputés extrêmement résistants.

APPAREIL ET TECHNIQUE :

Le projecteur standard que nous avons utilisé est constitué par un cylindre en pyrex d'une contenance de 3,5 litres dans le fond duquel est centré le vibreur piézoélectrique, disque de quartz interchangeable de 6 cm. de diamètre, monté en carter étanche. La face supérieure du vibreur est en contact direct avec le liquide à traiter, ce qui permet d'obtenir la transmission intégrale de l'énergie vibratoire produite. Le générateur, haute fréquence d'alimentation, prend environ 1.200 watts au secteur, son oscillateur est muni d'une lampe d'émission de 750 watts qui communique au liquide en contact avec la surface utile (11,2 cm²) du vibreur une puissance acoustique totale de 31 watts pour le quartz de 9 mm. d'épaisseur.

Nous avons utilisé des suspensions épaisses de microbes, soit dans une solution physiologique saline (*B. tuberculeux* BCG, *B. anthracis*), soit dans du liquide de Ringer (*Staphylococcus aureus*, *B. paradyssenteriae*, *Saccharomyces ellipsoideus*), soit dans un milieu isotonique phosphaté tamponné à pH = 7,3 (*B. dysenteriae*). 20 c. c. de ces suspensions sont placés dans une petite cloche de 4 cm. de diamètre dont le fond est constitué, afin

(2) R. W. WOOD et A. L. LOOMIS, London, Edinburgh et Dublin Philos. Mag. and J. Sci., 1927, 4, 417.

(3) N. HARVEY et A. L. LOOMIS, J. Bact., 1929, 17, 373.

(4) O. B. WILLIAMS et N. GAINS, J. inf. Dis., 1930, 47, 485.

(5) T. D. BECKWITH et A. E. OLSEN, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1931, 29, 362.

(6) F. L. HOPWOOD, J. Sci. Instruments, 1929, 6, 34.

(7) L. A. CHAMBERS et E. W. FLOSDORF, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1936, 34, 631.

(8) L. A. CHAMBERS et A. J. WEIL, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1938, 38, 924.

(9) M. PAÏC, V. DEUTSCH et S. BORCILA, C. R. Soc. Biol., 1935, 119, 1063.

(10) Nous profitons de cette occasion pour adresser nos meilleurs remerciements à M. Mangeot, de la Faculté de Pharmacie, et à M. Atribat, de la Société Kodak-Pathé, pour avoir mis à notre disposition leurs appareils et nous avoir aidés dans nos expériences.

d'éviter toute déperdition d'énergie acoustique, par une membrane de cellophane. Cette cloche est ensuite plongée dans l'eau qui recouvre la lame de quartz, le fond de cellophane à 1 cm. du vibreur, et centrée de façon à obtenir dans le liquide contenu dans la cloche le soulèvement, l'agitation et la cavitation maximum. Une simple circulation d'eau dans le vase pro-

NOM DU MICROBE	CONCENTRATION initiale de la suspension microbienne par c.c.	POURCENTAGE de mortalité	TEMPS d'exposition en minutes	ÉPAISSEUR de la lame de quartz en mm.	FRÉQUENCE en kilocycles
<i>B. paradysesteriæ</i>	6,2.10 ⁸	98	30	9	320
<i>B. anthracis</i>	3,5.10 ⁹	97,5	45	»	»
<i>B. megatherium</i> , souche Mutilat	4,4.10 ⁸	99,7	45	»	»
<i>Staphylococcus aureus</i>	40,2.10 ⁹	90,4	45	»	»
<i>Myco. tuberculosis</i> , souche BCG .	3,8.10 ⁹	75	75	»	»
<i>B. dysenteriæ Shigæ</i>	120,8.10 ⁹	88	30	4	680
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> . . .	1,3.10 ⁹	85	30	»	»

jecteur (ou de la glace pilée) permet de ne pas dépasser 15° pendant toute la durée de l'expérience.

La numération a été faite par ensemencement de dilutions convenables sur des boîtes de Petri et dénombrement des colonies. La numération du *Mycobacterium tuberculosis* souche BCG a été faite en comptant, après dilution convenable, la quantité de bacilles contenus dans 1/20 de c.c. étalé, séché puis coloré sur une lame.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Nous avons étudié 7 espèces microbiennes très différentes. Les résultats obtenus, résumés dans le tableau, montrent que l'activité létale des ultrasons oscille, suivant l'espèce microbienne et la concentration de la suspension, entre 75 à 99 p. 100. Les pourcentages de mortalité trouvés pour les *B. anthracis* et *B. megatherium* var. Mutilat sont bien en-dessous de la vérité, faussés par la mise en liberté des individus provenant de la désagrégation des chaînettes et qui peuvent donner chacun une colonie.

Sous l'effet des ultrasons, les purées microbiennes se clarifient plus ou moins suivant les microorganismes utilisés. Lorsqu'on centrifuge ces suspensions on obtient d'une part un liquide opalescent renfermant les substances solubles dans ces conditions (pH, concentration saline) et, d'autre part, un culot constitué par les quelques microbes intacts et par une masse souvent importante de débris microbiens insolubles dans le liquide employé. Le traitement de ces débris par des liquides appropriés permettra l'obtention éventuelle d'autres constituants microbiens. Nous n'insistons pas sur l'intérêt évident que présentent les extraits ainsi obtenus et qui nous permettent d'aborder divers problèmes immunochimiques. Nous signalons seulement, à titre d'exemple, que l'examen au fond noir, ou après coloration par la méthode de Ziehl, de la suspension d'une jeune culture de BCG ultrasonnée montre la libération d'une énorme quantité de granula-

tions cyanophiles (11), résultat que l'on ne pouvait obtenir jusqu'à maintenant que par des traitements chimiques très énergiques.

Le mécanisme de l'action des ultrasons sur les microorganismes n'est pas parfaitement élucidé ; il semble que plusieurs phénomènes peuvent coexister. Pour les uns (12), le principal facteur serait la cavitation ; la naissance des bulles gazeuses paraît produire un effet très brutal, causé par l'onde à front très raide qui l'accompagne, et qui peut développer d'énormes gradients de pression. Pour d'autres auteurs (13), la désintégration des microorganismes serait provoquée par les différences de pression existant entre les nœuds et les ventres de l'onde ultrasonore et qui peuvent dépasser 7 à 8 atmosphères. Les tranches de liquide où se trouve cette pression sont séparées par une demi-longueur d'onde ; elles sont donc d'autant plus rapprochées que la fréquence est plus grande ; cela pourrait impliquer une action plus efficace aux ultrasons de très grande fréquence. Nous nous proposons dans un prochain travail de vérifier cette hypothèse. Mais dès maintenant, nous pouvons dire qu'avec la technique employée, on arrive à obtenir en partant de suspensions très denses des extraits microbiens extrêmement riches et ceci à basse température et en l'absence de tout réactif chimique.

(Institut Pasteur, Service de Chimie microbienne.
Institut du Radium, fondation Curie.)

DIFFÉRENCIATION, PAR LA SYNERGIE LYTIQUE, DE DEUX PHAGES PRÉSENTS DANS UN MÊME FILTRAT ET DONNANT SUR GÉLOSE DES PLAGES D'ASPECT VOISIN

par PIERRE BALOZET.

Au cours du titrage sur gélose d'un filtrat bactériophagique (Bpm Roulant) sur une souche de *b. paratyphique B* (souche Roulant, variante R à l'état pur), j'ai eu l'occasion de constater un fait singulier : les dilutions 10^{-6} et 10^{-4} donnaient respectivement 5 et 265 plages de diamètre moyen (2 mm.) ; la dilution 10^{-2} donnait, comme il était normal, une lyse totale, suivie d'une culture secondaire ; mais il apparaissait, dès la formation de celle-ci, quelques plages (54) bien délimitées, devenant encore plus nettes à mesure que la culture secondaire s'épaississait et formait une couche bactérienne homogène (1).

(11) R. LAPORTE, *ces Annales*, 1945, **71**, 51.

(12) E. H. BIANCANI et A. DOGNON, *Presse Méd.*, 1934, **42**, 1503.

(13) N. MARINESCO, *C. R. Ac. Sci.*, 1932, **194**, 1824.

(1) SERTIC a décrit un phénomène du même genre pour un bactériophage du colibacille à propos de la formation d'une variante de ce bactériophage, devenant active sur la culture secondaire de cette bactérie. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 612.

Quelle pouvait être la signification de ces plages paradoxales ? J'ai pensé qu'on était en présence d'un filtrat contenant deux phages distincts donnant un phénomène de synergie assez semblable à celui décrit par P. Nicolle dans un mémoire récent (2). Dans l'expérience de cet auteur, 2 phages présents dans un même filtrat, et donnant l'un de grandes plages, l'autre de petites plages, les unes et les autres fugaces, formaient par synergie, aux endroits où des petites plages tombaient dans l'aire d'une grande, un aspect de plage criblée. Reproduisant expérimentalement le phénomène, P. Nicolle montra qu'en utilisant le bactériophage à grandes plages à une grande concentration de manière à couvrir la surface de la gélose d'une lyse totale suivie d'une culture secondaire continue (dose couvrante), et le phage à petites plages à une dilution donnant un nombre numérable de plages (dose paucicorpusculaire), ce dernier phage donnait des plages plus grandes, mieux percées et surtout plus durables que celles qu'il aurait formées seul.

Dans mon observation, le premier phage (phage I), de titre élevé ($1,2 \cdot 10^8$), donnerait, à la dilution 10^{-2} , sur toute la surface de la gélose, une lyse fugace à laquelle succéderait, après huit heures d'étuve, une culture secondaire abondante et homogène. Le second (phage II), beaucoup moins nombreux, se manifesterait alors par la formation de plages dans la culture secondaire résultant de l'action lytique du phage I. Ce mode de synergie diffère de celui constaté par P. Nicolle et, antérieurement, par Gratia (3) pour le principe lytique du colibacille : il s'agissait dans ces observations d'une action croisée des phages sur les variantes S et R d'une bactérie. Ici, les deux phages seraient actifs sur la variante R qui compose seule notre souche de para B, et le deuxième phage ne se distinguerait que par son action sur la culture secondaire du premier.

Pour vérifier l'hypothèse de la présence de deux phages distincts dans le filtrat, il fallait isoler les deux phages et reproduire l'expérience montrant leur action synergique.

1° *Isolement du phage I, le plus nombreux* : Le phage I a été obtenu à partir d'une plage isolée. Ce phage donne des plages moyennes fugaces ; à dose couvrante (10^{-2}), il donne une lyse totale suivie d'une culture secondaire abondante et homogène (caractère S à la trypanflavine), sans aucune plage persistante.

2° *Isolement du phage II* : Ce phage était beaucoup moins nombreux ; son titre relatif dans le filtrat était de 1 p. 500 du phage I.

Pour l'isoler, j'ai commencé par obtenir un filtrat plus riche en phage II : en prélevant à deux reprises successives le phage à la surface d'une plage synergique persistante sur la culture secondaire du filtrat initial dilué à 10^{-2} , j'ai obtenu un filtrat dont le titrage donnait le résultat suivant :

A 10^{-4} , 166 plages de deux aspects légèrement différents : les unes moyennes, semblables à celles du phage I ; les autres, plus petites et persistantes (40), devaient être attribuées au phage II, comme le démontrait le titrage de la même dilution avec le phage I à dose couvrante ;

(2) P. NICOLLE, ces *Annales*, 1944, 70, 155.

(3) A. GRATIA, *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, 821 ; ces *Annales*, 1933, 50, 306.

par cette méthode, on obtenait un nombre semblable de plages sur la culture secondaire du phage I.

A 10^{-2} , lyse totale avec culture secondaire tardive, représentée par d'assez grosses colonies isolées S et R. La culture secondaire résulte ici de l'action de deux phages à des titres voisins ; son aspect, bien différent de l'aspect homogène obtenu par action du seul phage I, est une nouvelle preuve de la non-identité des deux phages et de leur action synergique.

Le titre relatif du phage II étant devenu de 1 p. 4 du phage I, j'ai pu isoler le phage II à l'état pur à partir d'une plage du type petit et persistant. Les plages obtenues alors, bien que légèrement différentes de celles du phage I, sont d'un aspect tellement voisin qu'il serait impossible de les distinguer à coup sûr. La culture secondaire résultant de l'action du phage II pur se présente sous l'aspect d'un mélange de grosses colonies isolées R et S.

3° *Reproduction expérimentale de la synergie des deux phages* : J'ai employé la technique des doses couvrantes en étalant sur la gélose :

1° Une goutte de suspension bactérienne ;

2° Une goutte du phage I à dose couvrante (dilution 10^{-2}), destinée à donner une culture secondaire uniforme ;

3° Une goutte du phage II, aux différentes dilutions (10^{-6} , 10^{-4} , 10^{-2}).

J'ai obtenu les résultats suivants :

A 10^{-6} , culture secondaire uniforme et 4 plages persistantes petites et bien percées, reproduisant le phénomène observé avec le filtrat initial à 10^{-2} .

A 10^{-4} , 400 plages du même type, sur la culture secondaire uniforme.

A 10^{-2} , les deux phages se trouvant en même temps à dose couvrante, leur action synergique se manifeste, sur toute la surface de la gélose, en donnant une lyse beaucoup plus persistante et une culture secondaire constituée par de grosses colonies isolées d'aspect R et S.

Les deux phages ne sont donc pas identiques et ont pu être isolés à l'état pur. Il n'est pas encore possible, cependant, de préjuger de leur origine : le phage II pouvant être entièrement distinct du phage I, ou bien résulter d'une variation de ce phage (4).

CONCLUSIONS. — En titrant un filtrat bactériophagique, que rien, dans l'aspect des plages, ne permettait jusqu'alors de considérer comme un mélange de phages, j'ai constaté qu'à une certaine dilution, représentant une dose couvrante, la lyse, étendue à toute la surface de la gélose, était suivie d'une culture secondaire homogène, dans laquelle apparaissaient, contre toute attente, quelques plages.

Ces plages étaient dues à l'action synergique d'un phage peu nombreux, actif sur la culture secondaire résultant de l'action lytique d'un premier phage beaucoup plus nombreux.

(4) Depuis la rédaction de cette note, j'ai pu acquérir la preuve que cette dernière hypothèse était la bonne : le phage I donne, sous certaines conditions non précisées, naissance au phage II. Le phage II lui-même paraît capable de revenir à l'état I.

Ces deux phages ont pu être isolés, chacun à l'état de pureté, et l'expérience montrant leur synergie lytique a pu être reproduite par le procédé technique de P. Nicolle, consistant, lorsque deux phages sont actifs sur une même bactérie, à étaler le premier à dose couvrante et le second à dose paucicorpusculaire. A condition que le premier phage soit pur (isolé d'une plaque), et que la culture secondaire résultant de son action lytique à dose couvrante soit homogène, le second phage peut être différencié du premier par les plaques persistantes qu'il donne sur cette culture secondaire. La constatation de ce phénomène est une condition suffisante pour différencier deux phages que la morphologie de leurs plaques d'une part, et la grande inégalité de leurs titres d'autre part, ne permettraient pas de distinguer.

Remarquons que la non-constatation du phénomène ne suffirait pas pour affirmer la pureté du filtrat, deux phages n'ayant pas nécessairement une action synergique.

Avec cette restriction dans l'interprétation des résultats, le procédé consistant à éprouver un filtrat bactériophagique aux différentes dilutions avec, à dose couvrante, un phage provenant d'une plaque isolée donnée par le même filtrat, peut être systématiquement utilisé pour l'étude qualitative d'un filtrat bactériophagique.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

Paraîtront en *Mémoires*, dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, les notes suivantes :

Différences physiologiques entre deux variantes S et R de *Proteus vulgaris*, par Madeleine MOREL.

Précisions sur l'inactivation des bactériophages par les rayons ultraviolets, par R. LATARJET et R. WAHL.

Le Gérant : G. MASSON.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937 à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

Elle se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association.

Art. 2. — Elle est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les branches de la Science microbiologique.

Art. 3. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de Microbiologie (Microbiologie, Pathologie infectieuse, Immunologie, Chimiothérapie, Cancérologie), ou ayant publié des travaux de Microbiologie.

.....
Art. 9. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataires un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

Les membres français de l'Association constituent *ipso facto* et de plein droit, la SECTION FRANÇAISE de l'ASSOCIATION INTERNATIONALE DE MICROBIOLOGIE.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, le premier jeudi de chaque mois (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *ne varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : *nom* de l'auteur, *titre* du périodique (en abrégé et en italiques), *année* de publication, *tome* (en chiffres arabes gras), *page*. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séance du 2 mars 1944

SOMMAIRE

Recherches sur un nouveau coccus anaérobie, <i>Staphylococcus activus</i> n. sp., par A.-R. PRÉVOT et J. TAFFANEL	152
La désintégration des microbes par les ultrasons, par P. GRABAR et M. ROUYER	154
Différenciation, par la synergie lytique, de deux phages présents dans un même filtrat et donnant sur gélose des plages d'aspect voisin, par PIERRE BALOZET	157